

熱水抽出多糖類に着目した
Botryococcus braunii からの炭化水素
回収メカニズムの解明

跡部 季子

目次

第1章 序論.....	1
1.1 研究の背景	1
1.1.1 バイオマスエネルギー.....	1
1.1.2 藻類燃料.....	4
1.1.3 微細藻類を利用した燃料生産に関する国内外の取り組み	8
1.1.3.1 海外動向.....	8
1.1.3.2 微細藻類研究開発の国内プロジェクト	11
1.1.4 微細藻類の燃料化プロセスに関する技術課題	13
1.1.4.1 培養に関する技術的課題.....	14
1.1.4.2 回収・濃縮に関する技術的課題	17
1.1.4.3 オイル抽出に関する技術的課題	18
1.2 微細藻類 <i>Botryococcus braunii</i> からの炭化水素生産.....	20
1.2.1 <i>Botryococcus braunii</i> とは	20
1.2.2 <i>B. braunii</i> からの炭化水素回収技術	23
1.3 本研究の目的	26
1.4 本論文の構成	28
第2章 <i>B. braunii</i> から熱水抽出される多糖類の両親媒特性が炭化水素回収に与える 影響	29
2.1 背景および目的.....	29
2.1.1 <i>B. braunii</i> の高濃度スラリーからの炭化水素生産プロセスの研究開発.....	29
2.1.2 本章の目的.....	32
2.2 研究の方法	33

2.2.1	試料、培養、収穫.....	33
2.2.2	<i>B. braunii</i> の炭化水素含有率および熱水抽出される多糖類の溶出量測定	36
2.2.3	熱水抽出される多糖類の組成分析	38
2.2.4	熱水抽出される多糖類の分子量測定	39
2.2.5	熱水抽出される多糖類が炭化水素の回収溶媒に及ぼす影響.....	42
2.2.6	熱水抽出される多糖類が炭化水素回収に及ぼす影響	43
2.3	結果および考察.....	46
2.3.1	<i>B. braunii</i> の炭化水素と熱水抽出される多糖類の含有量	46
2.3.2	熱水抽出される多糖類の組成と分子量.....	47
2.3.3	熱水抽出される多糖類と炭化水素抽出溶媒との相互作用	52
2.3.4	熱水抽出される多糖類の両親媒特性が炭化水回収に及ぼす影響	55
2.4	まとめ.....	59
第3章 加熱処理法による <i>B. braunii</i> からの炭化水素回収メカニズムの解明		60
3.1	背景および目的.....	60
3.1.1	加熱処理法を用いた <i>B. braunii</i> からの炭化水素回収に関する既往の研究	60
3.1.2	本章の目的	61
3.2	研究の方法	62
3.2.1	試料、培養、収穫	62
3.2.2	<i>B. braunii</i> の藻体スラリーの熱分析	63
3.2.3	異なる温度で熱水抽出される多糖類の溶出量と組成分析.....	66
3.2.4	異なる温度で熱水抽出される多糖類の熱分析	67
3.2.5	熱水抽出される多糖類のゾル状態における炭化水素回収率測定	68
3.2.6	異なる温度で熱水抽出される多糖類の分子量測定	70
3.3	結果および考察.....	71
3.3.1	藻体スラリーのタンパク質の熱変性.....	71

3.3.2	異なる温度で熱水抽出される多糖類の溶出量と組成変化.....	76
3.3.3	異なる温度で熱水抽出される多糖類の熱物性変化	80
3.3.4	ゾルゲル転移を示す多糖類のゾル状態が藻体の炭化水素回収に及ぼす影響...	86
3.3.5	異なる温度で熱水抽出される多糖類の分子量	88
3.4	まとめ	90

第4章 特殊光源を用いた培養による *B. braunii* の多糖類の構成変化が炭化水素回収に及ぼす影響..... 92

4.1	背景および目的.....	92
4.1.1	炭化水素を蓄積する細胞外マトリクス（ECM）に関する既往の研究.....	92
4.1.2	本章の目的.....	94
4.2	研究の方法.....	95
4.2.1	特殊光源を用いた培養.....	95
4.2.2	培養時における紫色光の有無が <i>B. braunii</i> の炭化水素回収性に及ぼす影響 ..	99
4.2.3	培養時における紫色光の有無が <i>B. braunii</i> の炭化水素組成に及ぼす影響 ...	101
4.2.4	培養時における紫色光の有無が <i>B. braunii</i> の細胞外カロテノイド量に及ぼす影響.....	102
4.2.5	培養時における紫色光の有無が <i>B. braunii</i> から熱水抽出される多糖類量および組成に及ぼす影響.....	103
4.3	結果および考察.....	105
4.3.1	培養時における紫色光の有無が <i>B. braunii</i> の炭化水素回収率に及ぼす影響	105
4.3.2	培養時における紫色光の有無が <i>B. braunii</i> の生産量および炭化水素生産量に及ぼす影響.....	107
4.3.3	培養時における紫色光の有無が <i>B. braunii</i> の炭化水素組成に及ぼす影響 ...	109
4.3.4	炭化水素回収性が向上した <i>B. braunii</i> における細胞外カロテノイドの生産量	112

4.3.5 炭化水素回収性が向上した <i>B. braunii</i> における多糖類の溶出量および構成糖の 変化	114
4.4 まとめ.....	116
 第5章 結論.....	 117
5.1 本研究のまとめ	117
5.2 今後の展望.....	119
 参考文献.....	 120
 謝辞	 132

第1章 序論

1.1 研究の背景

1.1.1 バイオマスエネルギー

近年、石油など化石燃料の枯渇や、温室効果ガス排出による地球温暖化の問題を始めとした環境問題に対する意識の高まりを背景に、再生可能エネルギーの開発が行われている。再生可能エネルギーの中でも、植物バイオ燃料は太陽光と二酸化炭素で成長する植物バイオマス資源から生産される。バイオマスとは、広義的には光合成によって作られるすべての有機物質と定義されるが、バイオマスは多種多様で、分類法もいくつか提案されている [1]。その一例として、図 1-1 にバイオマスの分類を示す。バイオマスは、陸上植物や水生植物の生産系と、農林水産系や廃棄物系の未利用資源に分類される。未利用資源には、畜産系の牛・豚の糞尿や水産系の死魚など動物系資源が含まれるが、本論文では、バイオマスを「一定量集積してマテリアルやエネルギーとして利用できる植物起源の物質」と定義する。植物起源のバイオマスから生産される植物バイオ燃料は、燃焼する際の二酸化炭素の排出量と、植物が成長する際の光合成による二酸化炭素の吸収量がほぼ同じである。したがって、いわゆるカーボンニュートラルなエネルギーとして注目されるとともに、各種バイオマスからのバイオ燃料生産の可能性について検討されている [1]。糖やデンプン由来のバイオ燃料は、「第一世代」と称される。しかし、トウモロコシやサトウキビのような可食系バイオマスからのバイオ燃料の生産は、食料価格の高騰や世界的な食糧不足を引き起こす [2]。そこで、農業残渣や木質系バイオマスなど、「第二世代」と言われる食料とは競合しない非可食系（リグノセルロース系）原料を用いて生産するバイオエタノールの開発が促進された [3]。リグノセルロースは、セルロースとヘミセルロースをリグニンが保護する構造を持つため、単純な粉砕のみでは糖化が困難であり酵素糖化率が低い。そこで、リグノセルロースからバイオエタノールの生産を可能にするためには、アルカリ処理など適切な前処理を組み合わせる必要がある。近年、パルプ製造技術を利用し製紙工場にエタノール生産設備を併設することで、リグノセルロース系バイオマスからのエタノール

生産の可能性を示した報告もある [4, 5]。しかし、「第二世代」バイオ燃料は、「第一世代」よりも製造コストが高くなることが課題となっている。それに加え、原料が陸上植物であることから、土地利用において潜在的に食料生産との競合を引き起こす恐れがある。また水資源を必要とするなどのデメリットもあるのが現状である。その一方で、近年、これらの問題を解決する手段として、「第三世代」のバイオ燃料原料である微細藻類が注目されている。微細藻類は、「第一世代」や「第二世代」で問題視されてきた食料競合問題などを解決する資源として注目され、2000年代から急速にその利用に関する研究が進められてきた。特に注目すべき点は、微細藻類の燃料生産量に対する潜在能力の高さである。世界の石油需要量は 48.8 億 m^3 であるといわれている。地球上の全耕作面積(A)は約 19 億 8200 万 ha であるとして、もしも、石油需要量をすべてトウモロコシだけで賄うとすれば、A の 1430%（すなわち 14.3 倍）の土地が必要になる。単位面積当たりのオイル生産能力が高いといわれるパームでさえ、A の 41.3%必要となる。これに対し、微細藻類の場合、単位面積当たりのオイル生産能力ははるかに高く、A の 1.8~4.3%の土地で世界の石油需要量を満たすとの報告がある [6]。したがって、増殖速度やオイル含有量が高く、外部ストレスに強い藻種を見つけ燃料生産プロセスを確立できれば、「第三世代」のバイオ燃料は石油代替燃料として実用化が可能になると期待される。

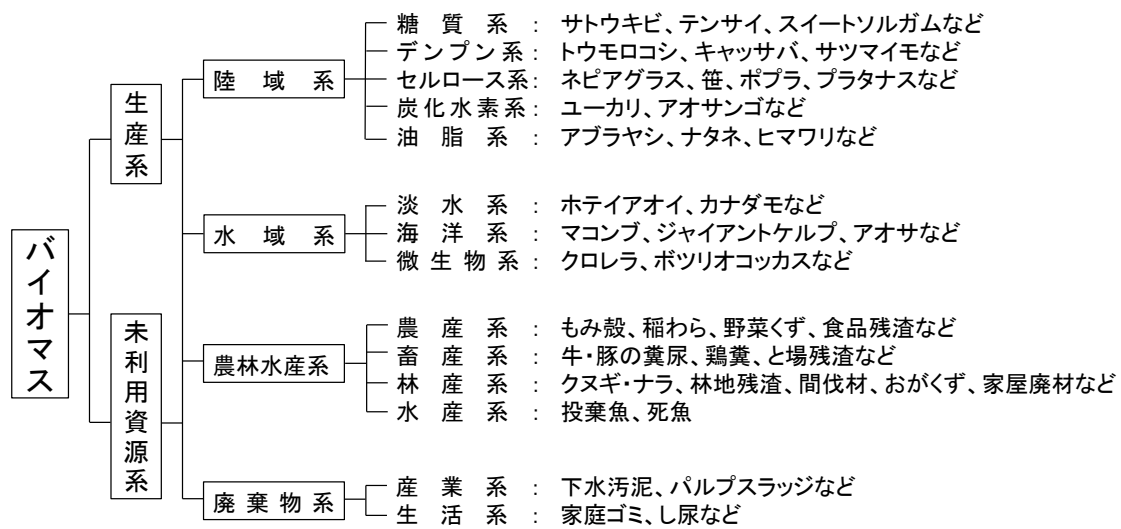


図 1-1 バイオマスの分類 ^[1]

1.1.2 藻類燃料

微細藻類が、「第三世代」のバイオマスエネルギー資源として注目を集めている理由の詳細を以下に記す。

- ①水、二酸化炭素、太陽光と微量のミネラル分があれば、食料生産用地を使わずとも、培養可能である。
- ②単位面積あたりのオイル生産量がほかの可食系バイオマスと比べ著しく高い。
- ③光合成による二酸化炭素の固定能力が高い。
- ④オイル以外の機能性物質を生産する。

以上のように微細藻類は、人類が直面する地球温暖化や食物価格の高騰などの危機を解決する手段となりうる。①の微細藻類の培養は、食用植物の生産には向かない土地の活用を想定している。②の微細藻類の生産量は、食用植物と比較しても非常に高い。さらに③で述べた二酸化炭素の固定能力を生かし、培養施設を火力発電所等に隣接して建設することで、温室効果ガスとして有害視される二酸化炭素排気ガスの効果的な利用も検討されている。④に掲げたように、微細藻類はオイルだけでなく、種々の機能性物質を生産する [7]。微細藻類の燃料生産だけを考えると、生産コストが高くなる問題が考えられ、オイル以外の機能性物質とバイオ燃料生産を併せたシステムを開発することが重要である。表 1-1 は、主要なオイル生産植物と微細藻類のオイル収率の比較である [8]。燃料生産に向く代表作物、パーム（アブラヤシ）と比較しても微細藻類のオイル生産性は、著しく高い。表 1-2 に種々の微細藻類のオイル含有量を示す。オイルを生産する微細藻類は、淡水または海水に存在し、乾燥重量に対して 20-50%のオイル含有量を持つものが比較的多いが、中には 75%程度含有する種も存在すると報告されている。特に、微細藻類からの燃料生産を検討する場合、オイルの質が重要になる。これまでに種々の微細藻類のオイル成分が調べられてきた [9, 10]。図 1-2 に微細藻類からの燃料生産のプロセスを示す。微細藻類が生産するトリグリセリド、炭化水素、炭水化物、およびタンパク質は、種々の燃料に変換することができる。トリグリセリドは、軽油代替として使用されている Bio Diesel Fuel（BDF）の原料に適している。しかし、そのままではディーゼルエンジンの燃料として利用しにくいいため、アルカリ系の触媒などを用いて、メタノールと反応（メチルエステル化）させ、グリセリンと

長鎖脂肪酸メチルエステルを合成し、その長鎖脂肪酸メチルエステルを BDF として使用する。BDF は、分子内に酸素を有するため、石油系燃料に比べて発熱量が小さい。一方で *Botryococcus braunii* のように、例外的に炭化水素を生産する微細藻類も存在する。炭化水素は分子内に酸素を含有しないので、発熱量が高く石油の代替燃料として適している。炭化水素には、既存の石油化学工場の設備をそのまま利用して、ガソリンやディーゼル油を生産できるという、大きなメリットがある。また微細藻類は、オイルの他に炭水化物やタンパク質等を生産する。炭水化物はエタノールの原料として、タンパク質やオイルを回収した後に残存する藻体残渣は、メタン発酵の原料として利用できる可能性がある。

表 1-1 主要なオイル生産植物および微細藻類のオイル収率の比較 ^[8]

作物	オイル収率 (L ha ⁻¹ y ⁻¹)
Soybean (大豆)	450
Camelina (カメリナ)	560
Sunflower (ヒマワリ)	955
Jatropha (ジャトロファ)	1,890
Oil palm (アブラヤシ)	5,940
Algae (藻類)	3,800-50,800

表 1-2 種々の微細藻類のオイル含有量 ^[10]

微細藻類	オイル含有量 (wt%)
<i>Botryococcus braunii</i> (ボツリオコッカス)	25-75
<i>Chlorella sp.</i> (クロレラ)	28-32
<i>Cylindrotheca sp.</i> (シリンドロテカ)	16-37
<i>Dunaliella primolecta</i> (デュナリエラ)	23
<i>Isochrysis sp.</i> (イソクリシス)	25-33
<i>Nannochloris sp.</i> (ナノクロリス)	20-35
<i>Nannochloropsis sp.</i> (ナノクロロプシス)	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i> (ネオクロリス)	35-54
<i>Nitzschia sp.</i> (ニツチア)	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (フェオダクチラム)	20-30
<i>Schizochytrium sp.</i> (シゾキトリウム)	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i> (テトラセルミス)	15-23

資源	原料	中間体	燃料
<ul style="list-style-type: none"> ・太陽光 (Sunlight) ・二酸化炭素 (CO₂) ・水 (Water) ・窒素源 (Nitrogen) ・ミネラル (Minerals) 	<ul style="list-style-type: none"> ・微細藻類 (Microalgae) 	<ul style="list-style-type: none"> ・トリグリセリド (Triglycerides) ・炭化水素 (Hydrocarbons) 	<ul style="list-style-type: none"> ・バイオディーゼル (Biodiesel) ・グリーンディーゼル (Green diesel)
		<ul style="list-style-type: none"> ・炭水化物 (Carbohydrates) 	<ul style="list-style-type: none"> ・エタノール (Ethanol) ・パラフィン系炭化水素 (Alkanes)
		<ul style="list-style-type: none"> ・タンパク質 (Proteins) ・藻体残渣 (Residual biomass) 	<ul style="list-style-type: none"> ・メタンガス (Methane) ・液状炭化水素 (FT liquids) ・水素 (Hydrogen)

図 1-2 微細藻類からの燃料生産^{[8] 改変}

1.1.3 微細藻類を利用した燃料生産に関する国内外の取り組み

1.1.3.1 海外動向

微細藻類のバイオマス利用を目的とした野外生産実験の開始は、1940年代である。第2次世界大戦後、ドイツ、米国、日本において藻類の食料化の研究が活発に行われた。ドイツのエッセンにおいて、産業排ガスに含まれる二酸化炭素利用の目的で、また、アメリカのスタンフォード研究所において、食料・飼料生産のためのタンパク質生産を目的とし、どちらも *Chlorella* を用いた研究が実施されたが、それらは基礎的研究を主眼としたものであった。同時期に、アメリカのカーネギー研究所が野外での大規模スケール培養の開発に乗り出し、日本においても徳川生物化学研究所において、*Chlorella* の循環式ポンド培養システムや閉鎖系循環法の開発が行われた [11]。

微細藻類を利用した燃料開発が本格的に行われるようになったのは、1970年代からである。現在、微細藻類からの燃料開発に最も力を入れているのは米国である。米国は、1970年代の第1次石油ショックの影響により、1978年からエネルギー省（Department of Energy : DOE）で藻類バイオマス資源から輸送用燃料を開発するためのプログラム（Aquatic Species Program : ASP）が進められた。国立再生可能エネルギー研究所

（National Renewable Energy Laboratory : NREL）は、ASPのもと約3000種の藻類を様々な水生生態系から採取し、輸送用燃料開発に向く種を見出し、クローズアウト・レポートにおいてその成果を報告している [12, 13]。2005年に米国で成立したエネルギー政策法（Energy Policy Act 2005）では、米国内で販売されるガソリンに対して、一定割合の再生可能燃料の混合を義務付ける基準（Renewable Fuel Standard : RFS）が導入された。その後、2007年に修正され成立した、エネルギー自立・安全保障法（Energy Independence and Security Act of 2007 : EISA）において、米国の再生可能燃料の生産と使用を2022年までに360億ガロンにすることを要求している。このうち、デンプンベースの従来型バイオ燃料の使用を150億ガロンと上限を定め、残りを先進バイオ燃料で補うことが求められた [11]。ここで先進バイオ燃料とは、セルロース系バイオ燃料、バイオディーゼル燃料およびその他の先進バイオ燃料を含む。2007年に設定されたRFS義務量を図1-3に示す [3]。

微細藻類からのバイオ燃料は、その他の先進バイオ燃料に当てはまり、各研究機関や企業で藻類バイオマス資源の燃料開発競争が始まった [13, 14]。RFS を受け、2008 年に DOE は藻類由来バイオ燃料コンソーシアムを創設し、競争的公募を通じて藻類由来バイオ燃料の実用化を促進しており、2010 年には Algal Biofuels Technology Roadmap を公表した。また、米国国防省（Department of Defense : DOD）は軍用燃料研究に力を入れ、2010 年には、空軍でバイオ燃料 50%ブレンドの燃料による初めての飛行実験に成功した。この中に藻類由来オイルも一部使用された [15]。さらに DOD は、2013 年に Farm-to-Fleet（農場から戦艦へ）プログラムを立ちあげ、ジェットエンジン用燃料及び戦艦のディーゼル燃料として、通常の燃料国内購入にバイオ燃料を組み入れることを表明した [16]。

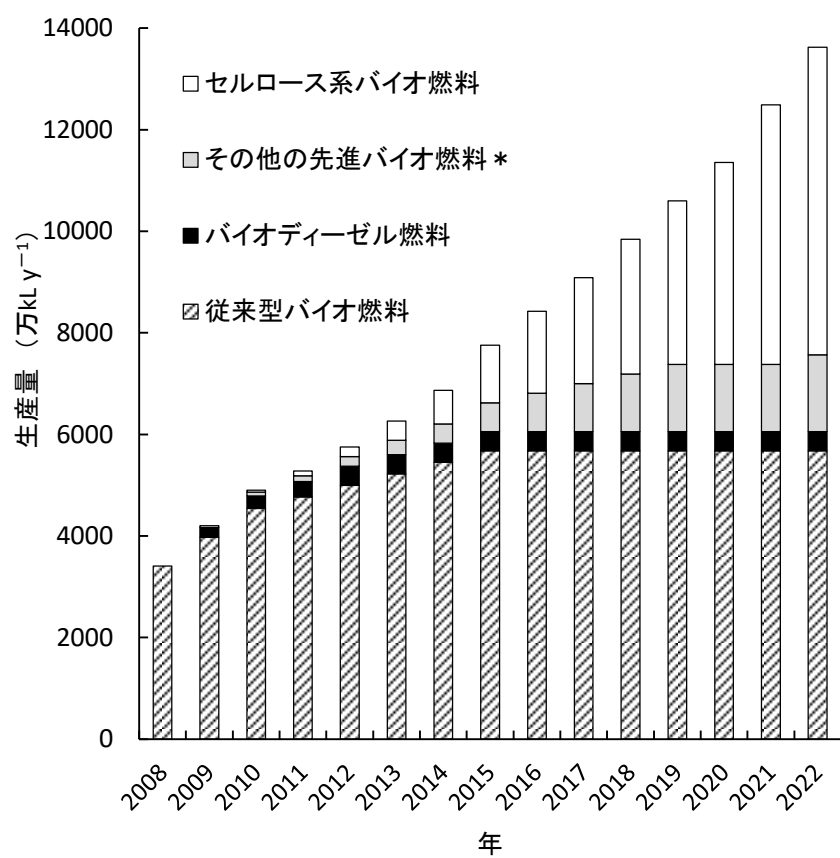


図 1-3 Renewable Fuel Standard (RFS)義務量 [3]

* 藻類からのバイオ燃料を含む。

1.1.3.2 微細藻類研究開発の国内プロジェクト

日本においても、藻類バイオマスの利用開発として、1990年からニューサンシャイン計画「細菌・藻類等利用二酸化炭素固定化・有効利用技術研究開発」が、当時世界最大規模の133億円の予算を投じ10年間にわたり実施された。事業活動により排出される二酸化炭素の固定から、藻類がもたらす機能性物質の利用までのシステムの概念を構築し、藻類の持つ二酸化炭素吸収の潜在能力を日本において初めて示したという点において成果があった。しかし、市場性や経済性の分析が不十分であり、市場の原油価格が安価安定となったことも相まって、国家プロジェクトとしての微細藻類の研究開発は一旦打ち切られた。

近年、再生可能エネルギーが注目される中で、2007年のNatureにおいて“Algae bloom again”という記事が掲載された。これがきっかけとなり、世界中で藻類燃料の開発が盛んになった[17]。日本においても、化石燃料の一部を補完する再生可能エネルギーとして微細藻類を利用したバイオ燃料の開発に期待が高まり、基礎研究から実証研究レベルまで種々の研究が行われている。2013年、International Symposium on Algal Biomassにおいて、経済産業省、文部科学省、農林水産省は、微細藻類バイオ燃料の開発について、2020年までに要素技術の開発を終え、2030年までに事業化するという目標を掲げた。以下に、三省庁で行われたプロジェクトを紹介する。

① 経済産業省【新エネルギー・産業技術総合開発機構：NEDO】

NEDOでは、2010年度から2016年度（7年間・2015年度予算：18億円）にかけて、「戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業」において、2050年の温室効果ガス大幅削減目標達成に向けた次世代バイオマスエネルギーの利用技術開発を行っている。

「Cool Earth—エネルギー革新技术計画」（平成20年3月経済産業省）において、2030年頃の実用化を見据えて、2014年度まで微細藻類由来のバイオ燃料製造技術開発が、次世代技術開発のなかで行われた[18]。

② 文部科学省【科学技術振興機構：JST】

JST では、2010 年度から 2013 年度「藻類・水圏微生物の機能解明と制御によるバイオエネルギー創生のための基盤研究の創出」に取り組んだ。チーム研究型の Core Research for Evolutional Science and Technology：CREST のプログラムの中で、藻類・水圏微生物の持つ、高い脂質・糖類蓄積能力や多様な炭化水素の産生能力、高い増殖能力に着目し、これらのポテンシャルを活かしたバイオ燃料創成のための基盤技術研究が行われた [19]。

③ 農林水産省

農水省の微細藻類に関連する研究開発プロジェクトとしては、地域活性化のためのバイオマス利用技術の開発「藻類等革新的な CO₂ 高吸収バイオマス利用技術の開発」が 2010 年度～2011 年度に行われた（2010 年度予算 2.2 億円）プロジェクトにおいて、微細藻類の探索や増殖装置の開発等が行われた。また、2012 年度には、「農村漁村におけるバイオ燃料等生産基地創造のための技術開発（予算 6 億円）において、「微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発」が行われ、微細藻類からの燃料製造技術の低コスト化や、搾油後の残渣を飼料、肥料として利用する技術の開発が行われた。事業化可能性調査としては、2011 年度農山漁村 6 次産業化対策事業に係る緑と水の環境技術革命プロジェクト事業「農山村における藻類バイオマスファームの事業化可能性調査」及び同助成金の 2010 年度緑と水の環境技術革命プロジェクト事業「耕作放棄地における微細藻類培養技術の確立と事業化方策の検討に係る事業化可能性調査～藻から石油とオメガ 3～」などがこれまでに行われている [20, 21]。

1.1.4 微細藻類の燃料化プロセスに関する技術的課題

微細藻類からの燃料生産を実用化するためには、種々の技術課題を解決する必要がある。

藻類からのオイル回収には、有機溶媒を用いる抽出法が一般的である。濃縮・脱水・乾燥などの工程が必要で、経済性、エネルギー収支面からの改善が求められている。図 1-4 に微細藻類からオイルの溶媒抽出分離・回収プロセスの概略を示し、各工程における課題について説明する。

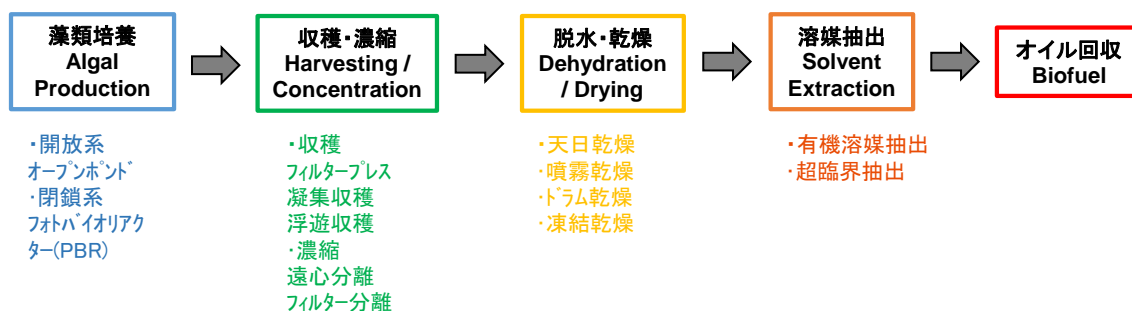


図 1-4 微細藻類からオイルの溶媒抽出・回収プロセスの概略

1.1.4.1 培養に関する技術的課題

実用化を見据えた微細藻類の培養に関しては、現在、開放系のオープンポンド型と閉鎖系のフォトバイオリアクター（Photobioreactor : PBR）を用いた研究開発が進められている。

オープンポンド型の一例であるレースウェイ方式は、大気開放の状態で藻類を培養プールに入れ、水を循環させながら培養を行う。例として図 1-5 にインドの Parry Neutraceutical 社のレースウェイ方式オープンポンドを示す [22]。オープンポンド型の利点は、初期設備費用が安価なことである。しかし、微細藻類を増殖させるために、太陽光と二酸化炭素を均一に供給するための攪拌作業が必要となる。また、開放系で培養した場合、常に大気にさらされていることから、汚染（コンタミネーション）が避けられない。さらに、開放系では、気温の影響を直接受けるために、気温が高過ぎると微細藻類が死滅し、気温が低過ぎると成長が遅くなるという問題も起こる。

一方で、閉鎖系の PBR では、外気から遮断されるため、コンタミネーションの問題は少ない。また、PBR では効率よく光を当てることができ、気温もある程度コントロールが可能となる。図 1-6 にオーストラリアの Ecoduna 社の PBR の例を示す [23]。室内に透明な平板型のリアクターを配置し、その中で微細藻類を培養する。このように、PBR は、開放系に比べて効率よい培養が可能となるが、初期投資や運転コストが開放系に比べて高くなるため、当面、高価な機能性物質の生産の用途に対応させるか、技術革新による大幅なコストダウンが必要である [20]。



図 1-5 Parry Nutraceutical 社(インド)の *Spirulina* 生産に使用されているレースウェイ方式 [22]



図 1-6 Ecoduna 社(オーストラリア)のフォトバイオリアクターPBR [23]

フォトバイオリアクターのパネルサイズ:1 枚あたり 50 m²

培養技術の共通の課題には、培養用の水源、二酸化炭素の供給、栄養成分の供給があげられる。微細藻類は水中で生きるため、培養には大量の水を確保する必要がある。開放系の培養では、水が常に蒸発するため、蒸発分を補う必要がある。この場合、海水性の微細藻類の培養であれば、海岸近くに設備を設置すればよいが、内陸地における培養や、淡水性の微細藻類の培養には、水の供給方法や水の確保を考慮する必要がある。さらに、微細藻類の生育に必要な二酸化炭素や栄養成分の供給も考慮する必要がある。これについては藻類の培養施設を発電所などに隣接設置し、発電所等から出る排ガスを利用することで解決できる可能性が高い。培養液に加える栄養成分は、生育に必要であるが、コストがかかる。そこで考えられているのは、産業排水等の利用である。排水に含まれる窒素源を利用すれば、排水処理の逆有償ともなり、低コスト化が期待できる。しかし、排水に含まれる雑菌などによるコンタミネーションの解決が課題となる [20]。このように、微細藻類の培養方法は、コンタミネーション、生育温度、栄養など種々の問題があげられる。これらの問題を解決するためには、成長速度が速く外部環境の影響を受け難い藻種が必要となる。

近年日本においても、複数の研究グループによるデモプラントの検討がなされている。電源開発株式会社と東京農工大学のグループは、低温環境下でも培養可能な耐冷性微細藻類のスクリーニングを行い、低温環境下（10℃）でも培養可能な好冷性微細藻類を取得した。取得株はオイル含量や藻体生産性が高く、屋外大量培養実験では生育阻害がなく増殖することが確認された。現在、同藻種のオイル蓄積誘導や、高密度培養による藻体生産性の向上について検討中である [24]。また、筑波大学と東北大学のグループは、東日本大震災で被害を受けた仙台市において、下水処理施設を利用した微細藻類から創生する新エネルギー生産技術を確立することを目的として、平成 24 年度より 5 か年計画で、東北復興次世代エネルギー研究開発プロジェクトを開始した。今後、実規模レベルでの開放系運輸燃料生産システムを建設して、*Botryococcus braunii* と *Aurantiochytrium* 2 種類の藻類を複合した培養システムによるエネルギー生産を検討するとしている [25]。また、IHI と株式会社ちとせ研究所（2015 年にネオ・モルガン研究所より社名を変更）、および神戸大学のベンチャー企業、ジーン・アンド・ジーンテクノロジー(G & GT)は、従来の *Botryococcus braunii* と比べて増殖速度が高い *Botryococcus braunii*・榎本藻の育種を行い、藻類バイオ燃料事業に関する技術開発を共同で実施している [26]。

1.1.4.2 回収・濃縮に関する技術的課題

微細藻類は、培養液中に低濃度で分散している。そこで、微細藻類から効率よく脂質や機能性物質を抽出するためには、微細藻類を回収・濃縮する必要がある。一般的な汚泥等の回収・濃縮には、フィルタープレスやスクリーンプレスが使用されるが、微細藻類の回収・濃縮には、藻体濃度や細胞径を考慮した機器選定が必要となる。藻類の回収・濃縮はバイオマス生産コストの 20-30%を占めるという報告もあり [27]、適切な方法を選択することが重要である。微細藻類の濃縮プロセスにおけるエネルギー評価を行った研究では、遠心濃縮、加圧浮上濃縮、ろ過濃縮において、ろ過濃縮の有用性を示した報告がある。しかし、ろ過濃縮は処理速度が遅く施設面積が大きいため、実用化のためのさらなる検討を必要とする [28, 29]。近年では、微細藻類の回収効率を向上させるために凝集沈殿法を用いて藻体を効果的な粒子サイズに凝集させ、脱水が容易な藻類フロック（凝集体）を生産する研究も行われている [30, 31]。毒性がなく安価で、低濃度利用が可能な凝集剤の選択が課題である。また、従来の淡水性培地に海水を添加させたところ、微細藻類のコロニーサイズが増大し、ろ過速度が向上したとの報告 [32]もあり、回収・濃縮コストの削減が期待される。

1.1.4.3 オイル回収に関する技術的課題

オイルを生産する微細藻類のほとんどは、細胞膜内に油を蓄積する。そのため、単に有機溶媒と混合しても、細胞膜内のオイルを回収することは出来ない。藻体を乾燥させてヘキサンなどの有機溶媒に浸すことで、オイルを回収することが可能となる。しかし濃縮後の藻体においても 90%以上は水分であり、潜熱の大きい水を蒸発させるために莫大なエネルギーが必要となる。このような課題を解決し、藻体からオイルを回収するために、湿潤なままの藻体からオイルを回収する技術開発が進められている。湿潤な藻体からオイルを回収する方法として、直接液化、超臨界流体抽出、ジメチルエーテル（DME）抽出などが報告されている。直接液化では湿潤な藻体を高温（250～350 ℃）、高圧（7～10 MPa）で反応させることで、重油状のオイルが得られる [33]。気体の拡散性と液体の溶解性を併せ持つ超臨界流体は、固体への浸透力が強く目的成分を溶出させる可能性を有している。特に、二酸化炭素は無毒でコストも低く、抽出物から容易に取り除けることから、超臨界二酸化炭素による微細藻類からのオイル回収が検討されている [34]。またメタノールも超臨界流体抽出の溶媒として検討されている [35]。抽出されたオイルを BDF として利用するために、超臨界メタノールを用い、オイル抽出とオイルのエステル交換反応を統合する研究も進められている。さらに、両親媒性を有する液化ジメチルエーテル（DME）を抽出溶媒として用いる研究もある。DME は常温・常圧で気体であるが、常温・5 気圧程度のわずかなエネルギーで液化した DME を湿潤藻体に接触させるだけでオイルを回収でき、抽出後の液化 DME も、常温下でわずかに減圧するだけで蒸発し容易に回収できる [36]。

なお、オイル回収には、該当する藻種を高い濃度で用意する必要がある。したがって増殖が速い藻種が望ましい。しかし、必ずしも高品質のオイルを生産する藻種の増殖が速いというわけではないので、常にコンタミネーションの問題が付きまとう。このような問題を解決する手法として、藻体を殺さず生きたままの藻体からオイルだけを回収し、藻体を再利用する「ミルキング」というアプローチがある。近年、遺伝子組み換え技術によってシアノバクテリアの細胞壁の性質を変化させることで、生成されたオイルを細胞外に放出させ、培養液の上層にオイルを蓄積させる研究も報告されている [37]。今後、微細藻類か

らオイルのみを回収しつつ高い藻体濃度を維持することが可能になれば、コンタミネーションを防ぎ、オイル回収効率が高まると期待される。

1.2 微細藻類 *Botryococcus braunii* からの炭化水素生産

1.2.1 *Botryococcus braunii* とは

微細藻類 *Botryococcus braunii* (以下 *B. braunii*) は炭化水素含有量が高く、バイオ燃料資源の一つとして期待されている [38-40]。 *B. braunii* は、緑色植物門トレボキシア藻綱に属する緑藻である [41]。世界中の様々な湖沼（主に淡水域）に生息するコスモポリタンな種として報告されており [42]、東京大学の三四郎池（本郷キャンパス）においても *B. braunii* の生息が確認されている。また、 *B. braunii* は、時には大量繁殖し、緑、赤、黄色に水表面を被覆する現象（ブルーム）も報告されている [43-45]。本藻種が炭化水素を生産していることが分かったのは、1960 年代後半のことである。イングランドの Oakmare 湖に発生したブルーミング由来のオレンジ色を呈する藻体から、 $C_{34}H_{58}$ のトリテルペン系炭化水素が単離、構造決定され、botryococcene と命名された [46]。また、本藻種の微細構造の痕跡が、オルドビス紀のオイル・シェール（化石燃料の一種）の中に認められたことから、世界各地に産出するオイルシェールの成因の一つであるとされ、地質学者が注目してきた [6, 47]。

図 1-7 に *B. braunii* の B 品種 Showa 株の光学顕微鏡写真を示す。本藻種の最大の特徴は、細胞同士が粘着性の多糖類などのバイオポリマーによって形成される細胞間マトリクス(Extra Cellular Matrix、以下 ECM)によって繋ぎとめられ、コロニーを形成していることである。多くの藻類が細胞内にトリグリセリドやワックスエステル（一価の脂肪アルコールと脂肪酸がエステル結合した脂質）など脂肪酸系の脂質を蓄積するのに対し、 *B. braunii* は、炭素原子と水素原子で構成される炭化水素を蓄積し、生産される大部分の炭化水素を細胞内ではなく細胞外に分泌して ECM 部分に蓄積する [48]。 *B. braunii* の生産する炭化水素の含有率は、乾燥藻体重量の 7~75%と報告されており、品種や培養条件を選択すれば、他の脂質生産性藻類と比べても著しく高い。また、大部分の藻種は窒素欠乏下のような増殖の停滞する定常期において脂質を蓄えるが、 *B. braunii* は細胞が活発に分裂する対数増殖期において炭化水素生産が最大になると報告されており [40]、藻体生産量の増大が直接炭化水素の増大につながると言われている。

B. braunii の品種は、現在、生産する炭化水素構造の特徴により 3 種類に分類されている [49]。C₂₅ から C₃₁ の奇数の炭素数を持ち、直鎖状の alkadiene 類および alkatriene 類を生産する A 品種 [50, 51]、また C_nH_{2n-10} (n=30 ~ 37) で示され、botryococcene 類および methylsqualene 類と呼ばれる分岐型不飽和トリテルペン系炭化水素を生産する B 品種 [52, 53]、さらに lycopadiene と呼ばれるテトラテルペンを生産する L 品種 [54, 55] である。B 品種の炭化水素含量は藻体の乾燥重量の 30~40% で [38]、中には 86% という報告もある [56]。図 1-8 に *B. braunii* の B race が生産するトリテルペン系炭化水素 C₃₄ botryococcene の構造式を示す。B 品種由来の分岐型不飽和トリテルペン系炭化水素は、そのままでは沸点が高く重油相当であり、直接内燃機関に用いるには適さないが、クラッキングを行うことによってガソリン相当 (60~70%)、軽油相当 (10~15%)、重油相当 (2~8%)、タール分 (5~10%) に改質できることから、3 品種の中では燃料源として最も有望であると考えられる [57]。さらに、炭化水素は、単位重量当たりの発熱量が高いため、重い燃料を運ぶのに適さない航空機向けの燃料として期待されている。

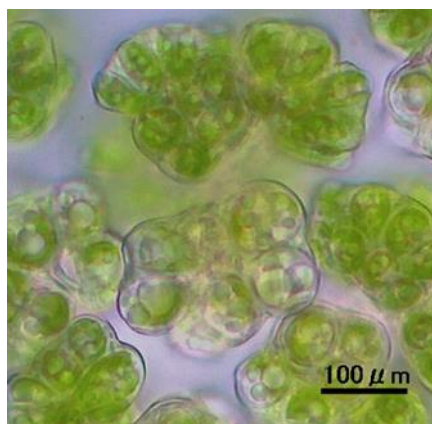


図 1-7 *Botryococcus braunii* の B 品種 Showa 株

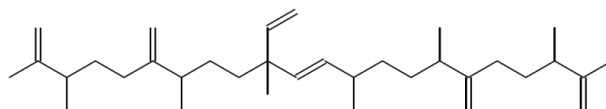


図 1-8 *B. braunii* の B race が生産するトリテルペン系炭化水素 C34 botryococcene の構造式

1.2.2 *B. braunii* からの炭化水素回収技術

B. braunii は、顕微鏡観察時にカバーガラスで藻体を圧迫すると、液状の炭化水素が群体から染みだしてくる様子が観察される (図 1-9)。そこで脂質の回収に細胞壁を破壊する必要がなく、単純な圧搾のみで容易にオイルを回収できると期待されていた。しかし、脱水後の濃縮藻体に油圧式圧搾機により 100 kg cm^{-2} の圧力を約 30 分かけても、回収できた炭化水素はわずかであった [58]。藻体が一層なら潰れて炭化水素が染み出すが、多層では互いの細胞間物質 (バイオポリマー) が緩衝材となることが原因と考えられる。結果的に、*B. braunii* から効率的に炭化水素を回収するためには、細胞を破砕する必要はないが、他の微細藻類と同様に藻体を乾燥させる必要があり、乾燥後にヘキサンなどの低極性有機溶媒で炭化水素を抽出するようになった。しかし乾燥工程には多大なエネルギーが必要となるため、乾燥工程を経ずに、湿潤状態のまま *B. braunii* からの炭化水素回収する方法が検討されている。

Frenz らは藻体スラリーに直接有機溶媒を混合し、炭化水素回収を試みた [59]。しかし、その回収率は 30 数%に留まっている。Lee らは *B. braunii* の藻体スラリーに加熱、ビーズミル、マイクロウェーブ、ソニケーション、浸透圧などの処理をして、有機溶媒を使用しない炭化水素回収の可能性を検討したが炭化水素回収用装置コストが増加する [60]。Dote ら [33] は、*B. braunii* の Berkeley 種を用い 300°C 、10 MPa で水熱液化することにより、湿潤な藻体から高収率でオイルを得ることに成功した。得られたヘキサン回収オイルの有機元素分析を行ったところ、C: 84.7%、H: 12.7%、N: 0.8%、O: 1.8%であり、油状化したオイル分は、およそ炭化水素で構成されているとしたものの、炭化水素以外の夾雑物も含まれており課題が残った。そこで Kita ら [61] は、乾燥藻体 1.5 g L^{-1} の低濃度の藻体スラリーを乾燥せず、水熱液化よりも低い 100°C 以下の温度で加熱前処理し *n*-ヘキサンによる炭化水素の回収を行った。Kita らの方法は、加熱前処理法と呼ばれ、炭化水素を溶媒回収する際の前処理として藻体スラリーに加熱処理を施す。以後「加熱前処理」を「加熱処理」と記す。Kita らは、この加熱処理法を用い、 90°C で加熱処理を施すことにより、藻体スラリーの持つ 95%以上のオイル分を回収することに成功した (図 1-10 参照)。*B.*

braunii の B 品種 Showa 株より得られたオイルは、有機元素分析から、C: 87.23%、H: 12.46%、N: 0.03%で構成されることを確認した。Dote ら [33]の水熱液化法に対し、加熱処理温度を 100℃以下に抑えた加熱処理法のほうが、酸素原子を含まない良質な炭化水素を回収できることを明らかにした。この加熱処理による炭化水素回収プロセスを図 1-8 に示す。乾燥工程を経ないことで、製造に必要とするエネルギーを削減でき、実用化を目指す上で有効であると思われる。

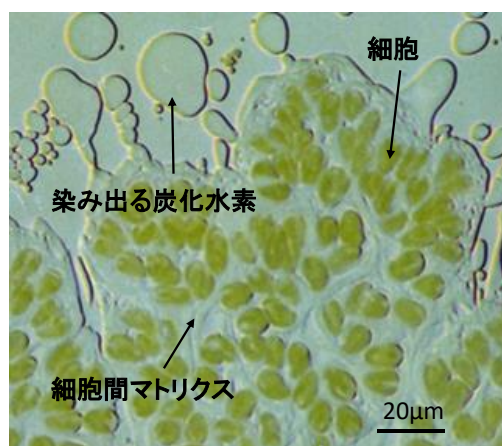


図 1-9 *Botryococcus braunii* の細胞およびコロニーの光学顕微鏡像

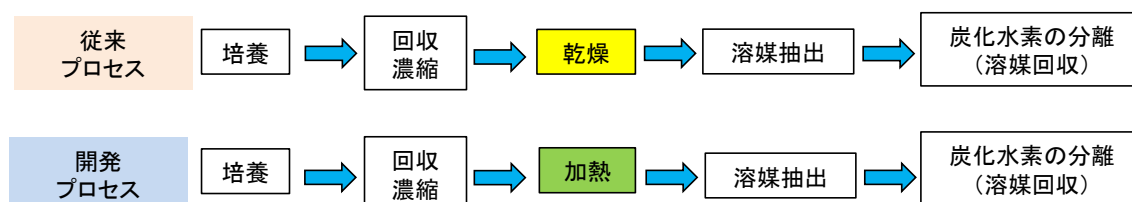


図 1-10 *Botryococcus braunii* の加熱処理法による炭化水素回収プロセス

Magota ら [62]は、複数の *B. braunii* の品種によって実験を行い、炭化水素の回収には加熱処理時間ではなく藻種に応じた一定の加熱処理温度が必要であることを明らかにした。しかし、藻体からの炭化水素生産を実用化するには、加熱に要するエネルギーを少なくするため藻体スラリーをより高濃度に濃縮したうえで炭化水素を回収する必要がある。そこで筆者らは、80 g L⁻¹まで濃縮した高濃度スラリーを加熱処理し、ヘキサンを加え遠心分離したところエマルジョンが発生し、ヘキサン相と炭化水素が接触できずに炭化水素が回収できなかった。しかし、加熱前処理後に熱水抽出される多糖類（液相）を除去した藻体スラリー（固相）を、再度水分調整してヘキサンを添加したところ、炭化水素を効率的に溶媒回収することに成功した [63]。一方で、Weiss ら [47]は、透過型顕微鏡を用い *B. braunii* のコロニーの観察を行った。*B. braunii* のコロニーは、細胞間マトリクス（ECM）中の”retaining wall”と呼ぶ多糖類の層で囲まれており、炭化水素はこの層の中に保持されていることを報告している。さらに、Weiss らは、組成分析から retaining wall“部分がガラクトースとアラビノースを主成分とする多糖類であることを示した。本研究の2章で、*B. braunii*からの熱水抽出物が、ガラクトースとアラビノースを主成分で構成される多糖類であることを明らかにしたことから（表 2-4 参照）、熱水抽出される多糖類は、Weiss らの”retaining wall”と呼ばれる多糖類の層の一部であると考えられる。さらに、Magota らは、藻体コロニーの表面を可視化するために、藻体スラリーに墨汁を添加し、生物顕微鏡を用いて藻体コロニーの観察を行った。未加熱の藻体は、コロニーを覆う層の存在が観察された一方で、炭化水素が回収可能となる加熱処理温度では、コロニー表面を覆う層がなくなっていることを確認した [64]。以上の知見から、熱水抽出により多糖類の層がはがれると、藻体から炭化水素が回収されやすくなるのではないかと考えられる。

このように、加熱処理法を用いた炭化水素回収の研究成果から、①湿潤な *B. braunii* から炭化水素を溶媒抽出するためには、加熱処理が必要であること、②炭化水素回収の実用化を想定した場合、高濃度藻体スラリーから分離される熱水抽出物（多糖類）を除去する必要があることがわかった。しかし、これまでの研究では加熱処理による炭化水素回収率向上のメカニズムや熱水抽出物の特性は不明であった。

1.3 本研究の目的

加熱処理法を用いた *B. braunii* からの炭化水素回収プロセスは、乾燥法に比べてエネルギー投入量が少なく、製造コストが安価であると思われる。図 1-11 に加熱処理法による *B. braunii* からの炭化水素回収率を示す。90℃の加熱処理を施すと藻体の持つ 95%以上の炭化水素を回収できるのに対し、80℃の加熱処理で回収率は 5%以下と低い。90℃の加熱処理を施すことで炭化水素が回収可能となるメカニズムは不明である。

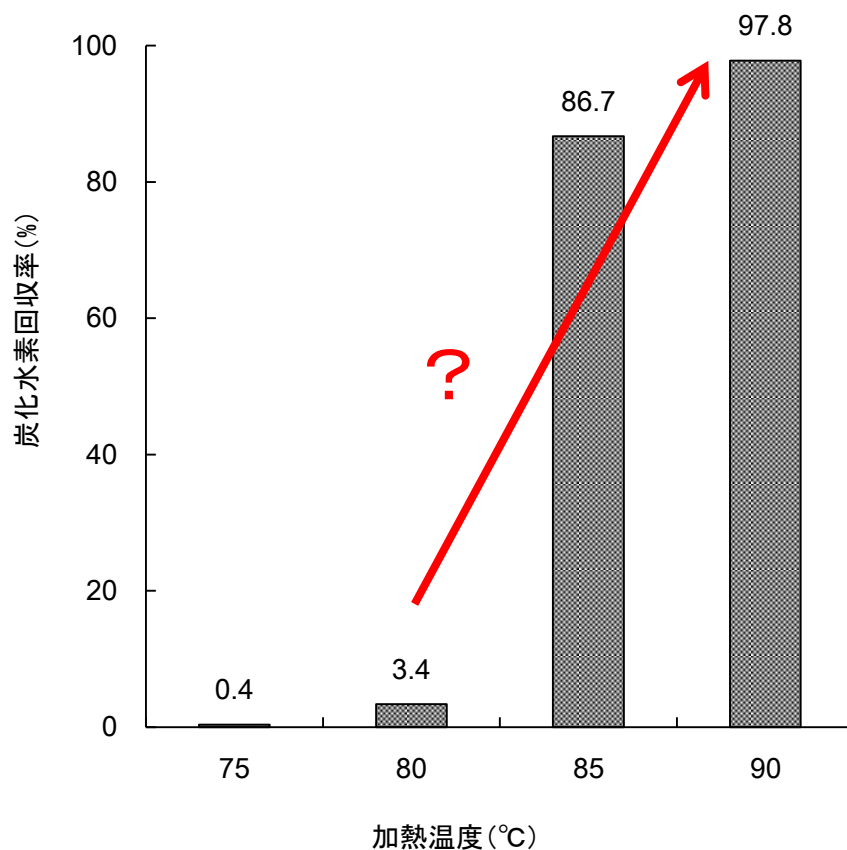


図 1-11 加熱処理法による *B. braunii* からの炭化水素回収率 [62 改変]

図 1-12 に我々が提案する高濃度に濃縮した藻体スラリーからの炭化水素回収プロセスを示す。藻体を高濃度に濃縮した場合、加熱処理後に藻体から分離される熱水抽出物（多糖類）を除去しなければ藻体スラリーからの炭化水素回収はできないが、その理由も不明である。

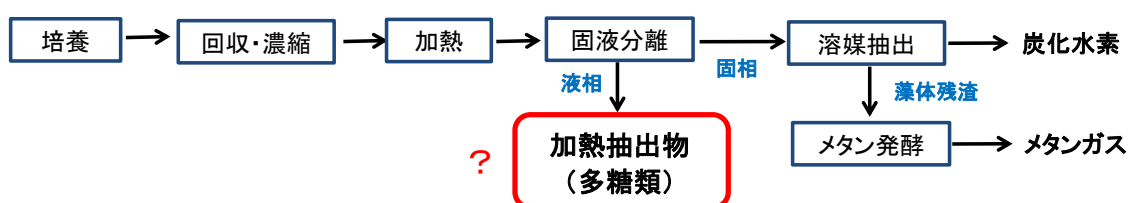


図 1-12 提案する高濃度藻体スラリーからの炭化水素回収プロセス

そこで本研究では、*B. braunii* から加熱処理により熱水抽出される多糖類に着目し、多糖類の化学組成や分子量を明らかにする。次に、多糖類の物理的特性を示し、炭化水素の回収に用いる有機溶媒との相互作用を明らかにする。以上により、まず、*B. braunii* からの炭化水素回収を高効率に行うためには、炭化水素回収プロセスから多糖類を除去する必要があることを説明する。次に、多糖類の熱物性変化を明らかにし、藻体スラリーに対して 80℃ の加熱処理では不可能であった炭化水素回収が、90℃ の加熱処理で可能となるメカニズムを説明する。最後に、藻体からの炭化水素の回収を阻害する熱水抽出多糖類の構成成分を明らかにする。以上を本研究の目的とした。

1.4 本論文の構成

本論文は全 5 章により構成される。第 1 章では、研究の背景および意義、本研究の目的を述べた。高濃度に濃縮した *B. braunii* から炭化水素回収を可能にするためには、90℃で加熱処理をする必要があり、加熱後に熱水抽出される多糖類を除去することで炭化水素の溶媒回収が可能となる。第 2 章では、炭化水素が回収可能となる 90℃で熱水抽出される多糖類の藻体からの溶出量や組成、分子量、物理的特性を明らかにする。さらに、炭化水素の回収に用いる有機溶媒との相互作用を示し、熱水抽出される多糖類を藻体から除去することで炭化水素回収が容易になる理由を説明する。第 3 章では、藻類を構成するたんぱく質や熱水抽出される多糖類の熱物性変化を明らかにする。そして、藻体タンパク質の熱変性前後の 60℃、70℃、80℃、90℃で溶出する多糖類の構成成分と熱物性、分子量の違いを明らかにし、80℃の加熱処理では不可能であった藻体スラリーからの炭化水素の溶媒回収が、90℃で可能となるメカニズムを説明する。第 4 章では、同じ *B. braunii* の Showa 株を異なる光照射条件で培養し、炭化水素回収率の高い藻体と炭化水素回収率の低い藻体を培養する。これらの藻体から熱水抽出される多糖類の構成糖を比較することで、炭化水素回収を阻害する多糖類の構成糖を明らかにする。第 5 章では、研究を総括し、今後の展望を述べる。

第2章 *B. braunii* から熱水抽出される多糖類の両親媒特性が炭化水素回収に与える影響

2.1 背景および目的

2.1.1 *B. braunii* の高濃度藻体スラリーからの炭化水素生産プロセスの研究開発

B. braunii からの炭化水素回収は、藻体を乾燥させた後、ヘキサン等の低極性有機溶媒で回収する方法が一般的である。しかし、乾燥法は非常に多くのエネルギーが必要であり、乾燥プロセスを省略することが、バイオ燃料生産の実用化をはかる上で解決しなければならない大きな課題であった。Kita らおよび Magota らは、 1.5 g L^{-1} の低濃度の藻体スラリーを 100°C 以下で加熱処理し、ヘキサンで溶媒抽出することで、乾燥工程を経ることなく効率的に *B. braunii* から炭化水素を回収することに成功した [1, 2]。しかし、*B. braunii* からの炭化水素回収を実用化するには、加熱処理に必要なエネルギーを少なくするため、藻体を高濃度に濃縮したうえで藻体スラリーから炭化水素を回収する必要がある。そこで筆者らは、藻体スラリーを 50 g L^{-1} まで濃縮し加熱処理し、Kita らの方法で炭化水素の回収を試みたところ、炭化水素を回収することができなかった。まず、図 2-1 のように藻体スラリーを加熱処理すると、藻体から多糖類と思われる熱水抽出物が分離した。次にヘキサンを加え炭化水素の回収を試みたところ、ヘキサン相にエマルジョンが発生し、藻体から炭化水素をヘキサンで回収できなかった(図 2-2(a))。そこで、図 2-1 中の加熱後の熱水抽出物を除去した藻体スラリーにヘキサンを添加したところ、炭化水素が効率的に溶媒回収された(図 2-2(b))。このように加熱抽出物を除去することで、 80 g L^{-1} まで高濃度に濃縮した藻体スラリーから藻体の持つ炭化水素の 95% 以上を回収することに成功した [3]。

以上の研究から、*B. braunii* の低濃度藻体からの炭化水素回収プロセスでは、藻体量に対し炭化水素回収するための溶媒量が十分にあったため気が付かなかったエマルジョンという現象が、藻体を高濃度にすると顕著に現れ、炭化水素の回収が困難になる。一般に海藻などの藻類を熱水中で加熱処理すると、それぞれの藻類に特有な多糖類が抽出される。従って、*B. braunii* の熱水抽出物も多糖類であると考えられる。既往の研究において、*B. braunii* の培養過程で排出される多糖類の報告はあるが [4]、熱水抽出される多糖類に関す

る研究は殆どない。高濃度の炭化水素回収プロセスは、多糖類と思われる熱水抽出物を取り除くことで炭化水素を回収できるようになる。しかしながら、この *B. braunii* から熱水抽出される多糖類の化学組成や分子量、そして多糖類の化学的特性や物理的特性は不明である。*B. braunii* から熱水抽出される多糖類が炭化水素の回収に及ぼす影響についても不明である。

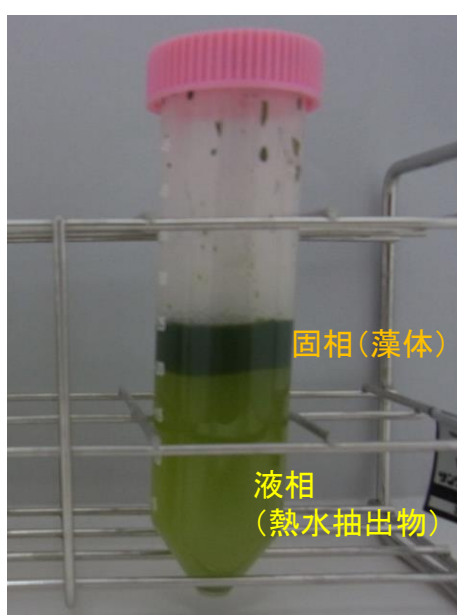


図 2-1 加熱処理後の濃縮スラリーから熱水抽出物(多糖類)を分離した様子

上段:炭化水素が含まれる固相、下段:多糖類が含まれる

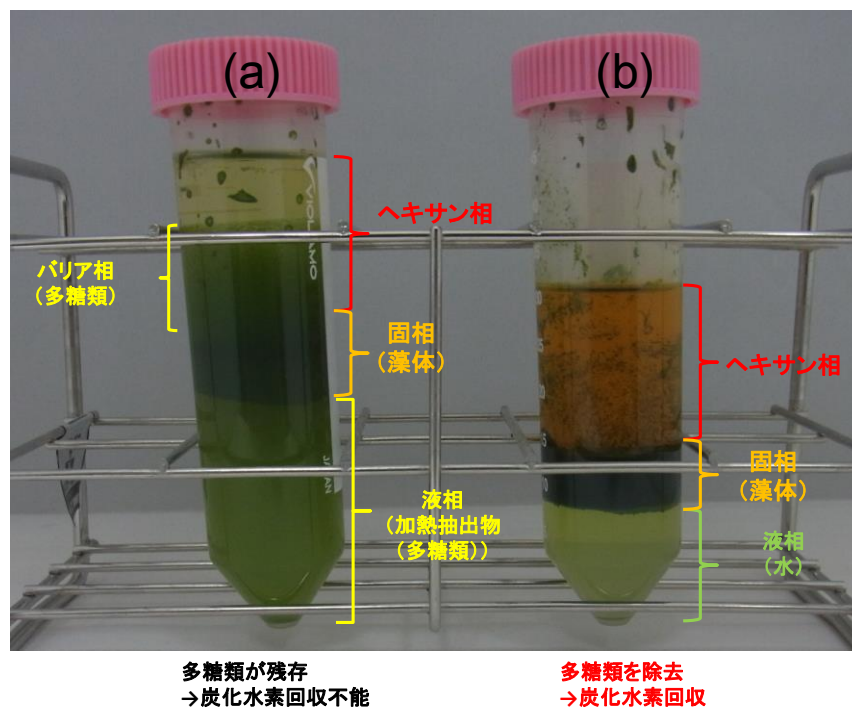


図 2-2 ヘキサンによる藻体からの炭化水素回収

- (a) 加熱処理後の濃縮スラリー(図 2-1)にそのままヘキサンを加えたところ炭化水素を回収できなかった固相とヘキサン相の間に多糖類バリアー相を作っている。
- (b) 加熱処理後の濃縮スラリー(図 2-1)から加熱抽出物(多糖類)を除去した藻体に水を加えスラリー濃度を調節してヘキサンを加えたところ、炭化水素を回収出来た。ヘキサン相がオレンジ色に着色しているのは、炭化水素を上手く抽出できたことを示している。

2.1.2 本章の目的

第2章では、*B. braunii*の藻体スラリーを加熱処理後、熱水抽出される多糖類を除去することで炭化水素が溶媒回収可能になる理由を明らかにすることを目的とした。まず初めに、*B. braunii*の藻体スラリーから熱水抽出される多糖類の溶出量、化学組成、分子量を調べる。次に、*B. braunii*から熱水抽出される多糖類と藻体の炭化水素回収に使用する有機溶媒との相互作用を明らかにする。さらに、加熱処理後の藻体スラリーに残存する熱水抽出可能な多糖量が炭化水素回収に及ぼす影響について検討し、*B. braunii*からの炭化水素回収プロセスにおいて、熱水抽出される多糖類を除去することで炭化水素を高効率に溶媒回収できることを示す。

2.2 研究の方法

2.2.1 試料、培養、収穫

本研究では、*B. braunii* の B 品種である Showa 株を用いた (図 2-3)。この株は 1988 年に California 大学 Berkeley 校において分離されたものである。藻体の培養は、室温 25℃ に保たれたグロースチャンバー内で行った。培養液は改変された Chu13 培地を用いた [5]。改変 Chu13 培地は *B. braunii* の培養に広く用いられている。改変 Chu13 培地に含まれる栄養塩を以下に示す。KNO₃ (600 mg L⁻¹)、MgSO₄ · 7H₂O (100 mg L⁻¹)、K₂HPO₄ · 3H₂O (52 mg L⁻¹)、CaCl₂ · 2H₂O (54 mg L⁻¹)、FeNaEDTA (10 mg L⁻¹) を 900mL の精製水に溶かし、さらに微量元素混液として H₃BO₃ (572 mg L⁻¹)、MnSO₄ · H₂O (308 mg L⁻¹)、ZnSO₄ · 7H₂O (44 mg L⁻¹)、CuSO₄ · 5H₂O (16 mg L⁻¹)、Na₂MoO₄ · 2H₂O (12 mg L⁻¹)、CoSO₄ · 7H₂O (18 mg L⁻¹) に調製したものを 5 ml 加えた。培養液の pH は 7.2–7.5 の範囲になるよう希硫酸を用いて調整し、藻体の植え継ぎ前にはオートクレーブにより培養ビンおよび培養液の滅菌を行った。二酸化炭素濃度を 1.0% に富化した空気を、シリコンチューブにより HEPA フィルターを通した後に培養ビン内に底部から供給した。グロースチャンバーを図 2-4 に示す。グロースチャンバー内の光量子束密度は培養瓶の表面近傍で約 100 μmol m⁻² s⁻¹、明暗 12 時間周期とした。藻体試料の培養に用いている培養ビンの構成を図 2-5 に示す。藻体の収穫は培養開始から約 30 日経過した後に行った。藻体の収穫は、孔径 20 μm のナイロンメッシュシートを使用し、培養液を吸引濾過し湿藻体を得た。得られた藻体スラリーを純水で希釈し、50 L⁻¹ の濃度に調整した。



図 2-3 *B. braunii* B 品種 Showa 株の細胞およびコロニーの光学顕微鏡写真

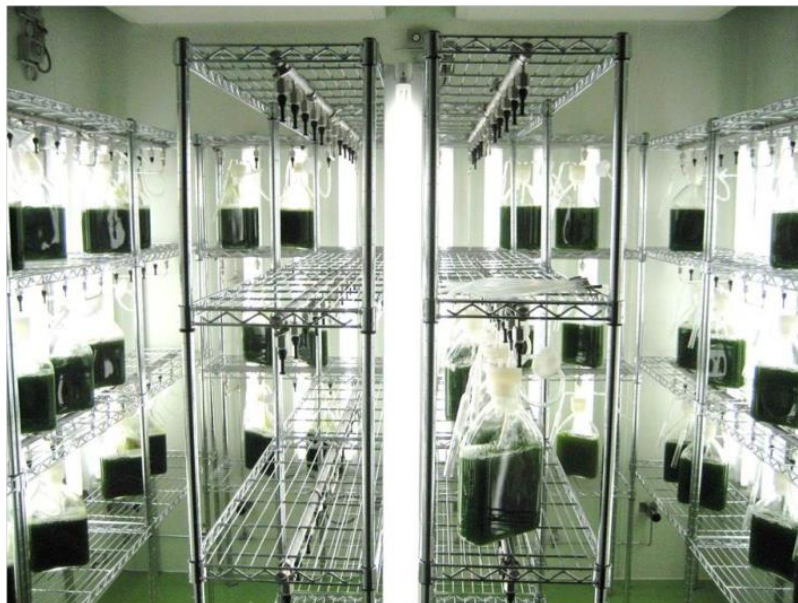


図 2-4 藻体を扁平型培養ビンで培養している培養室

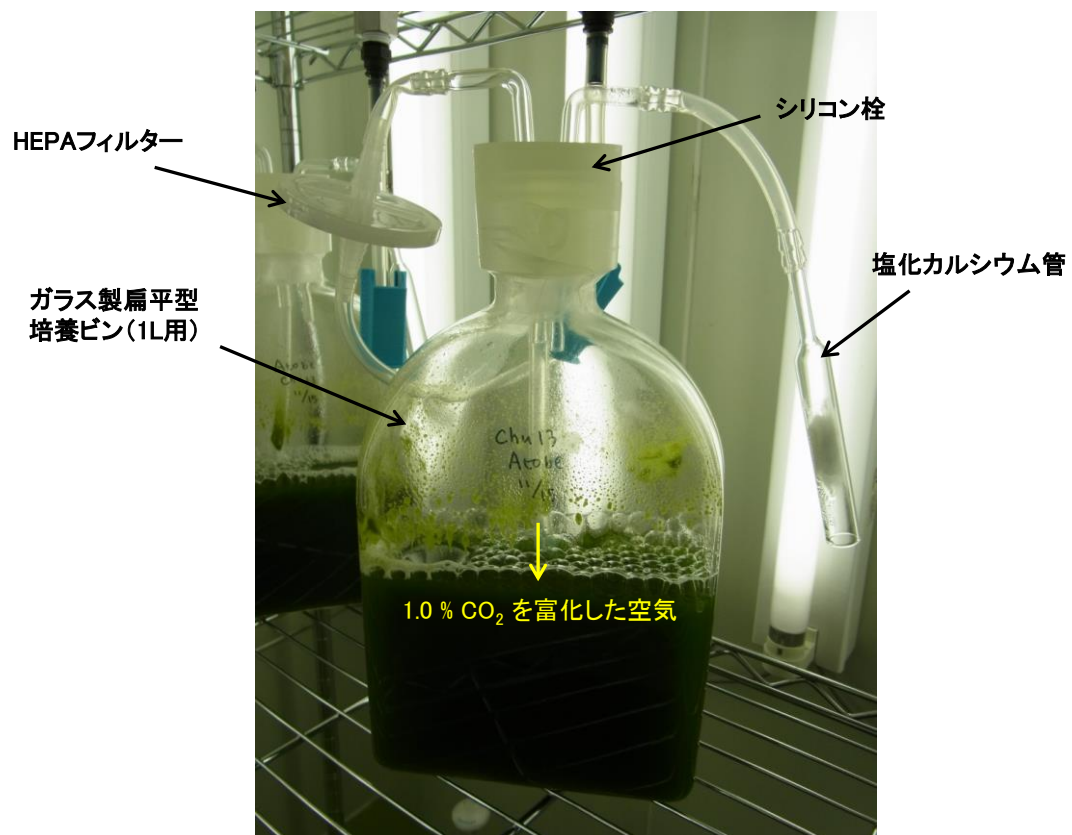


図 2-5 二酸化炭素 1.0%を富化した空気を供給しているガラス製扁平型培養瓶

2.2.2 *B. braunii* の炭化水素含有率および熱水抽出される多糖類の溶出量測定

第 2 章における実験フローの内、*B. braunii* 中の炭化水素含有率および熱水抽出される多糖類の溶出量測定を図 2-6 中の太字で示す。

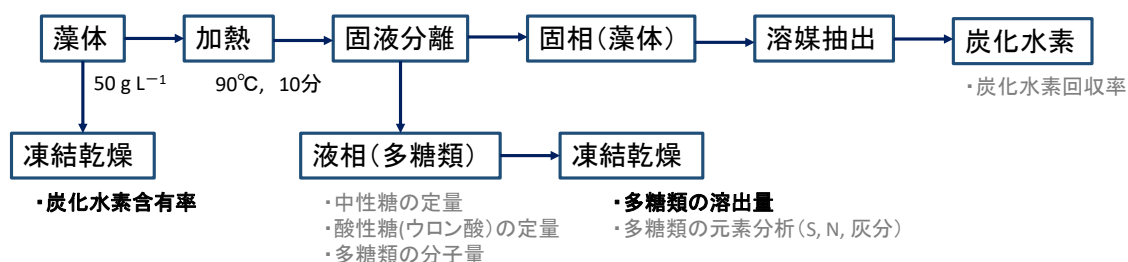


図 2-6 炭化水素含有率および熱水抽出される多糖類の溶出量測定の実験フロー

B. braunii の乾燥藻体中に含まれる炭化水素含有量を下記の通り定量した。50g L⁻¹ の藻体スラリーを凍結乾燥し、凍結乾燥物に *n*-ヘキサン(以下ヘキサンと略)を加えて静置後、黄色に着色したヘキサン相をナス型フラスコに分離した。この操作をヘキサン相が無色透明になるまで繰り返した。分離後のヘキサン相をロータリーエバポレーターにより減圧蒸留し、ヘキサンを除去した。減圧蒸留により得られた抽出物を、*B. braunii* の炭化水素画分とした。炭化水素画分は色素などの夾雑物を含む。そこで、この夾雑物を除き炭化水素の精製を行うために、シリカゲルカラムクロマトグラフ(和光純薬工業製ワコーゲル、C-300)に付し、展開溶媒としてヘキサンを用いて炭化水素を回収した。シリカゲルカラムを通過したヘキサン相は、ロータリーエバポレーターを用いて減圧蒸留し、ヘキサンを除去した。ヘキサンを完全に除去した後の抽出物を乾燥藻体中の炭化水素とみなした。炭化水素は、抽出物の重量を測定することにより定量した(以下重量法)。

次に、*B. braunii* からの熱水抽出される多糖類の溶出量の定量を下記の通りに行った。50 L⁻¹ の藻体スラリーを 10 mL ずつ遠心チューブに分注し、ウォーターバス(HWA-50, アズワン株式会社)を用い 90°C で 10 分間加熱処理した。加熱容器内の試料温度は試料の中心

部に挿入した温度計により測定した。加熱処理後の藻体スラリーを遠心分離（LC-200, 3650 ×g, 10 min, 株式会社トミー精工）し、液相を分離した。液相を凍結乾燥し、乾燥物の重量を測定して熱水抽出される多糖類の溶出量とした。

2.2.3 熱水抽出される多糖類の組成分析

B. braunii から 90℃で熱水抽出される多糖類の組成分析を次の手順で行った。中性糖の定量は、NREL 技術報告書 [6]に記載された方法をもとに、硫酸による加水分解により行った。加水分解液中のグルコース、ガラクトース、アラビノース、マンノースの分析には、糖分析用カラム SUGAR SP0810（商標登録 Shodex, 昭和電工株式会社）、示差屈折率検出器 (RID-10A, 株式会社島津製作所) を搭載した高速液体クロマトグラフ (HPLC: LC-20, 株式会社島津製作所) を用いた。一方、酸性糖であるウロン酸の定量についても、D-ガラクトツロン酸や D-グルクロン酸を標準物質として高速液体クロマトグラフにより、比較的容易にしかも正確に分離、定量が可能である。しかし、分析用カラムや標準物質の購入に費用が掛かること、また、*B. braunii* の熱水抽出物に何の酸性糖成分が含まれていることが不明であることから、本研究では、ウロン糖（酸性糖）の定量を、より簡易に酸性糖量を測定するのに一般的なカルバゾール硫酸法により行った。試料を調製後、分光光度計（U-2001, 株式会社日立製作所）により波長 530nm の吸光度を測定した。グルクロン酸濃度に換算し、ウロン酸相当量とした。窒素の定量は、全自動元素分析装置（2400 II, PerkinElmer Co., Ltd.）により行った。硫黄および灰分の測定は、元素分析装置（MT-6, 株式会社ヤナコ機器開発研究所）を用いて行った。第 2 章の実験フローの内、*B. braunii* から 90℃で熱水抽出される多糖類の組成分析を図 2-7 中に太字で示す。

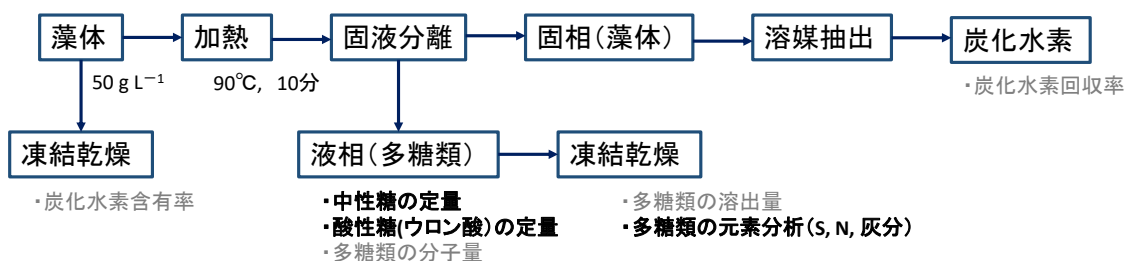


図 2-7 90℃で熱水抽出される多糖類の組成分析の実験フロー

2.2.4 熱水抽出される多糖類の分子量測定

一般的に、多糖類などの高分子の物性は分子量に大きく依存することから、対象となる高分子の分子量を把握することは重要である。



図 2-8 熱水抽出される多糖類の分子量測定に用いた高温ゲル浸透クロマトグラフ

GPCは、Gel Permeation Chromatography(ゲル浸透クロマトグラフィー)の略で、分子サイズの差に基づいて分離を行う液体クロマトグラフィーの一種であり、高分子物質の平均分子量および分子量分布を測定する手法である。高分子鎖が希薄溶液中でとっている大きさと同じくらいの大きさの細孔を有する粒状ゲルを充填したカラムに試料溶液を注入すると、分子量の高い分子、すなわち、溶液中における分子サイズが大きいものは、ゲル表面の細孔への浸透が少なく、分子量の低いものよりも早くカラム中を移動して溶出する。逆に分子サイズが小さいものは、ゲル表面の細孔に深く浸透し、分子量の高いものよりも遅くカラム中を移動して溶出する仕組みである。*B. braunii*から熱水抽出される多糖類の分子量を高温 GPC (HLC-8120, 東ソー株式会社)、カラム (TSKgel- G4000PWXL+ TSKgel- G6000PWXL いずれも内径 7.8 mm×長さ 30 cm, 東ソー株式会社)を用い測定した。高温 GPC の外観を図 2-8 に示す。

まず、高温 GPC に供する多糖類サンプルを下記の通り作成した。30 日培養した藻体を間隙が 20 μm のナイロンメッシュとビフネルロートを用いて減圧吸水することにより脱水して収穫した。収穫した藻体を移動相として用いる溶離液 0.2 M リン酸緩衝液溶液に懸濁させて 50g L⁻¹ に調整した。この藻体スラリーを 10 mL ずつ遠心チューブに分注し、ウォーターバス (HWA-50, アズワン株式会社) を用い 90°C で 10 分間加熱した。加熱中の試料温度は試料の中心部に挿入した温度計により測定した。加熱処理後の藻体スラリーを遠心分離 (LC-200, 3650 \times g, 10min, 株式会社トミー精工) し、分離された液相を測定サンプルとした。測定溶液ならびに移動相用溶媒は、予め 0.45 μm 孔サイズのミリポアフィルターでろ過した。以上により準備したサンプルについて高温 GPC を用い分子量の測定を行った。分析条件等を以下に示す。

- ・ 注入量 : 100 μL
- ・ 検出器 : 示差屈折率検出器
- ・ カラム : TSKgel- G4000PWXL+ TSKgel- G6000PWXL
(内径 7.8 mm \times 長さ 30 cm)
- ・ システム温度 (オートサンプラー、RI 検出器、カラムオーブン、溶媒ストック槽) : 70°C
- ・ 溶離液 : 0.2 M リン酸緩衝液 : 流速 1.0 mL min⁻¹

分子量は、分子量既知の標準試料の分子量と溶出時間より作成した検量線より求めた。本測定では、分子量既知の標準物質として、プルラン [7] (分子量範囲 $5.90 \times 10^3 \sim 2.56 \times 10^6$ の 10 点, 昭和電工株式会社) を用いた (表 2-1)。検量線から、重平均分子量 (M_w) および分子量分布指数 (M_w/M_n) を求めた。第 2 章の実験フローの内、熱水抽出される多糖類の高温 GPC による分子量測定を図 2-9 中に太字で示す。

表 2-1 GPC 測定に使用した標準プルラン

プルランは枝分かれのない多糖類高分子で、水に容易に溶解し安定な水溶液となる。水溶液の諸物性も十分に研究されており、分子量および分子量分布が精密に測定できる利点を持つ。

分子量 (Mw)	Mw/Mn (メーカー指示値)
2560000	1.49
1330000	1.37
708000	1.27
375000	1.10
200000	1.11
107000	1.13
47100	1.07
21100	1.09
9600	1.09
5900	1.09

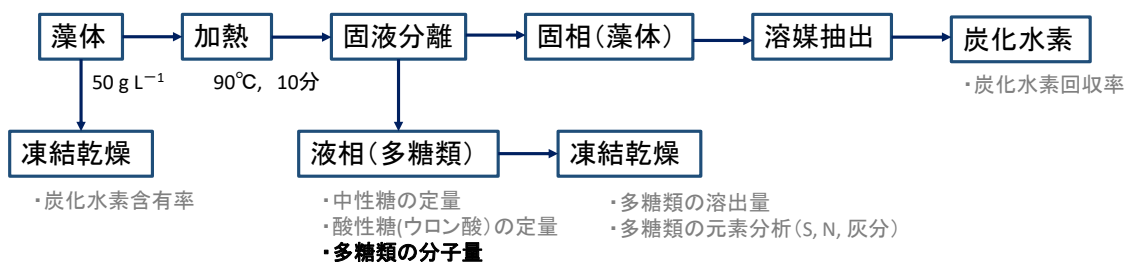


図 2-9 炭化水素および多糖類解析の実験フロー

2.2.5 熱水抽出される多糖類が炭化水素の回収溶媒に及ぼす影響

藻体から熱水抽出される多糖類と炭化水素の回収に使用する有機溶媒との相互作用を確認するために、目視と粘度測定の方法を用い検討した。まず初めに、藻体から熱水抽出された多糖類の凍結乾燥物を水に溶解し 0.5 wt% 多糖類溶液に調製した。この多糖類溶液 4 mL とヘキサン 4 mL を混合し、1 分間激しく振とうし、振とう後の様子を観察した。次に、攪拌開始後 2 分が経過した時点から粘度測定を開始した。粘度測定には、少量サンプルアダプターとスピンドル SC4-18 を搭載した粘度計 (LVDV2T, Brookfield AMETEK, Inc.) を使用した。測定温度は 25°C, 1 rpm (1.32 s^{-1}) で 10 秒毎にデータを取得した。第 2 章の実験フローの内、多糖類溶液とヘキサンの混合における粘度測定を図 2-10 に太字で示す。

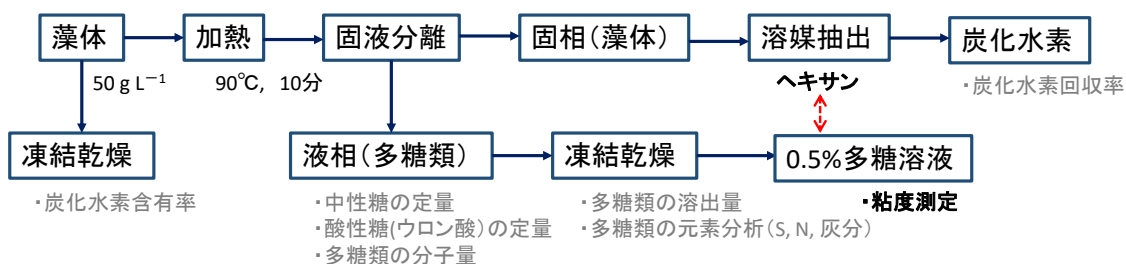


図 2-10 多糖類溶液-抽出溶媒混合系の粘度測定の実験フロー

2.2.6 熱水抽出される多糖類が炭化水素回収に及ぼす影響

熱水抽出可能な多糖類が藻体スラリーに残存した場合、炭化水素の回収が阻害される可能性が考えられる。このことを確認するために、熱水抽出多糖類が炭化水素回収に及ぼす影響について検討し、炭化水素を 95%以上回収するために許容される多糖類の残存濃度（藻体中の熱水抽出される多糖類の残存量）を明らかにした。

初めに、「熱水抽出される多糖類を十分に除去した藻体スラリー」の調製を下記の手順で行った。まず、藻体濃度 50g L^{-1} に調整した藻体スラリーを、ウォーターバスを用い 90°C で 10 分間加熱した。これを遠心分離 (LC-200, $3650 \times \text{g}$, 10 min, 株式会社トミー精工) し、多糖類が熱水抽出された液相を除去した。次に、除去した液相と同量の水を入れて攪拌し、再度遠心分離し液相を除去した（洗浄 1 回目）。さらに 1 回目の洗浄と同量の水を入れて攪拌し、再び遠心分離し液相を除去した（洗浄 2 回目）。2 回の洗浄後得られた藻体を含む率 85% に調整し、熱水抽出される多糖類を十分に除去した藻体スラリー（以下多糖類除去藻体）とした。この藻体スラリーはヘキサンを混合するだけで容易に炭化水素を回収できる状態にある。この手法は、先の研究で開発され、高濃度藻体スラリーから高効率に炭化水素を回収する「加熱処理法」として報告された [3]。

次に、多糖類除去藻体に所定量（85% 含水の藻体スラリー 1g に対して 0、0.05、0.1、0.15、0.2、0.3、0.5、1.0 wt%）の多糖類を乾燥状態で添加し、藻体スラリー中に十分に溶解させ、藻体から炭化水素を回収した。炭化水素回収溶媒には、測定時に揮発しにくい *n*-デカン（ $\text{C}_{10}\text{H}_{22}$, boiling point: 174.2°C , 以下デカン）を用いた。図 2-12 に示すように、本研究では、*B. braunii* からの炭化水素回収において、デカン抽出がヘキサン抽出と抽出量や抽出成分に相違がないことを確認している。所定量の多糖類を添加した試料に対し乾燥藻体重量比 5 倍量のデカンを添加し、攪拌機 (MMW-1000W; 東京理化器械株式会社) を用いて 1 時間攪拌後、固液分離 (LC-200, $3650 \times \text{g}$, 10 min; 株式会社トミー精工) し、炭化水素が含まれるデカン相（液相）を得た。得られたデカン相から、キャピラリーカラム (Rtx-1; 30 m) を搭載したガスクロマトグラフ (GC: GC-2014, 株式会社島津製作所) を用い、炭化水素の定量を行った。GC 測定は、カラム温度は初期温度を 50°C で 1 分間保持し、 50°C から 220°C まで $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で昇温させ 3 分間保持したあと、 $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で 260°C まで昇温させて 3

分間保持した。検出器 (FID) の温度を 280℃とし、キャリアーガスはヘリウムを使用した。各濃度の多糖類を添加した藻体スラリー試料から得られる炭化水素のクロマトグラムの最大のピークにつき、その面積を測定し、炭化水素量に換算した。

多糖類除去藻体の炭化水素回収率は、下記のとおり測定した。まず、加熱処理法 [3]にしたがって、炭化水素を抽出し、炭化水素回収量 (A_0) を測定した。ここで 2.2.2 に記載の凍結乾燥を経る重量法で抽出・定量した炭化水素含有量 (B_0) は、藻体の持つ全炭化水素量であると仮定できることから、 B_0 に対する多糖類除去藻体の炭化水素回収量 (A_0) の比より、多糖類除去藻体の加熱による炭化水素回収率 (C_0) を求めることができる。以上より測定した多糖類除去藻体の炭化水素回収率 [$C_0=A_0/B_0 \times 100$ (%)] を、GC 測定により得られた C34_b (a-d は構造異性体) botyococcene の最大ピーク面積 (D_0) と同定した。次に、それぞれの濃度の多糖類を添加した藻体スラリー試料の炭化水素回収率 (C_x) を、試料のクロマトグラムにおける最大のピーク面積 (D_x) から、多糖類除去藻体のピーク面積 (D_0) を基準に炭化水素回収率 ($C_x=C_0 \times D_x/D_0$) に換算し求めた。

以上により、多糖類を十分に除去した藻体スラリーに、多糖類を添加して、炭化水素回収率の変化測定することで、藻体に熱水抽出される多糖類が残存したときの炭化水素回収に及ぼす影響を確認した。第 2 章の実験フローの内、藻体スラリーの炭化水素回収に及ぼす多糖類の影響を検討するための実験を図 2-11 に太字で示す。

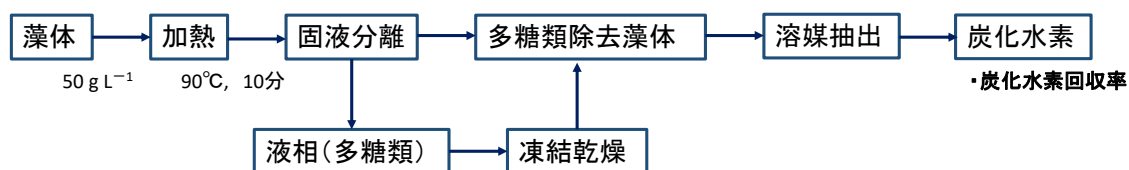


図 2-11 藻体スラリーの炭化水素回収に及ぼす多糖類の影響を検討した実験フロー

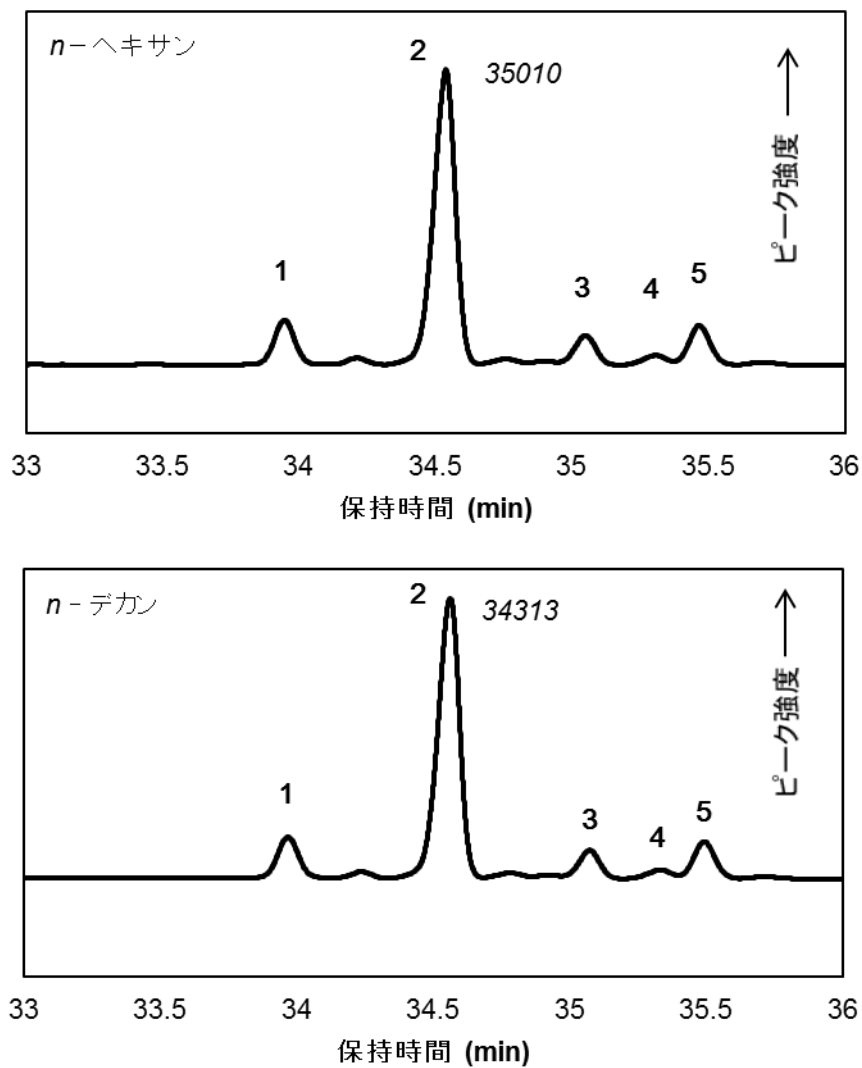


図 2-12 2種類の有機溶媒を用いて藻体スラリーから回収した炭化水素のクロマトグラム

2.3 結果および考察

2.3.1 *B. braunii* の炭化水素と熱水抽出される多糖類の含有量

表 2-2 は乾燥藻体の炭化水素含有量と、50g L⁻¹の藻体スラリーを 90℃で 10 分間加熱後に、熱水抽出された多糖類の溶出量を示す。炭化水素含有率は、乾燥藻体あたり 33.2 wt% ±1.0 wt% (n=3) であった。これは、従来の知見とほぼ同じである [3]。また、熱水抽出される多糖類の溶出量は、乾燥藻体あたり 9.4 wt% ±0.2 wt% (n=3) であり、乾燥藻体に 10%近くの熱水抽出可能な多糖類が含有していることが明らかになった。図 2-13 に凍結乾燥させた多糖類の外観を示す。

表 2-2 *Botryococcus braunii* Showa 株の炭化水素含有量と 90℃で熱水抽出される多糖類量

成分	熱水抽出多糖類の含有量 (dry wt%)
炭化水素	33.2 ± 1.0
熱水抽出される多糖類	9.4 ± 0.2



図 2-13 50g L⁻¹の藻体スラリーから 90℃で熱水抽出された多糖類を凍結乾燥させた多糖類の外観

2.3.2 熱水抽出される多糖類の組成と分子量

表 2-3 は、50g L⁻¹ の藻体スラリーを 90℃ で 10 分間熱水抽出して得られた多糖類の組成を示す。*B. braunii* から熱水抽出される多糖類は、中性糖 60.9%、酸性糖 17.4%、計 74.3% の炭水化物で構成され、中性糖であるガラクトース、アラビノース、酸性糖であるウロン酸を主成分とすることが明らかとなった。酸性糖量については、カルバゾール硫酸法において定量され、カルボキシル基（ -COO^- ）を持つグルクロン酸濃度に換算してウロン酸相当量として算出した。

近年、酸性糖を含有する水溶性多糖類が注目されている。例として、表 2-4 に *B. braunii* から熱水抽出された多糖類とコンブから抽出した粗フコイダンおよび市販のアルギン酸ナトリウムの化学組成の比較を示す。コンブやワカメから熱水抽出されるフコイダンは、カルボキシル基（ -COO^- ）を持つウロン酸や硫酸基（ -SO_3^- ）を持つエステル硫酸を含有する粘質多糖類である。一方、アルギン酸ナトリウムは、エステル硫酸はほとんど含まない、ウロン酸を中心に構成される多糖類である。アルギン酸ナトリウムは、保水剤、増粘安定剤、乳化剤およびゲル化剤としての食品用途や、コレステロール低下作用、高血圧抑制作用などの機能が認められていることから医薬品用途として幅広く利用されている[8, 9]。また、フコイダンについても抗ガン作用、コレステロール並びに高血圧抑制作用、抗アレルギー作用やなど、現代人の健康に欠かせない機能が学術的に明らかにされており、医薬品や化粧品、健康食品として利用されている [8-10]。

本研究において *B. braunii* から熱水抽出された多糖類は、構成糖成分として酸性糖であるウロン酸を持つ点が、アルギン酸ナトリウムやフコイダンと共通している。また、組成中の硫黄 (S) が非常に少なかったことから、エステル硫酸はあまり含まれておらず、窒素 (N) を 1.8% 含むことから、タンパク質、N-アセチル-D-グルコサミン（グルコースの 2 位ヒドロキシル基がアセチルアミノ基に置換された単糖： $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_6$ ）や、これらが糖類と結合して糖タンパクやヒアルロン酸（N-アセチル-D-グルコサミンとグルクロン酸の二糖単位が連結した構造）のような形態として存在している可能性も示唆された。

次に、*B. braunii* から熱水抽出される多糖類の分子量測定の結果を示す。正確な分子量測定には、熱水抽出多糖類と同一の構造で、既知の分子量分布の狭い標準ポリマーを用いる

必要があるが、現実的に困難である。そこで本測定では、市販のポリマーである分子量既知のプルランを使用した。高温 GPC（ゲル浸透クロマトグラフィー）におけるプルランの検量線を図 2-14 に示す。また各分子量のプルランと 90℃で抽出された多糖類のクロマトデータの比較を図 2-15 に示す。GPC 法から、検量線を利用して、数平均分子量（Mn）[式 2-1]と重量平均分子量（Mw）[式 2-2]が得られる [11]。

$$Mn = \frac{\sum (Mi \cdot Ni)}{\sum Ni} = \frac{\sum Ci}{\sum Ci/Mi} \quad \cdots \text{式 2-1}$$

$$Mw = \frac{\sum (Mi^2 \cdot Ni)}{\sum (Mi \cdot Ni)} = \frac{\sum (Ci \cdot Mi)}{\sum Ci} \quad \cdots \text{式 2-2}$$

ここで、 N はポリマーの分子数、 M は分子量、 C は試料濃度(wt/vol.)、（ C はモノマーの単位数に比例する $C \propto M \cdot N$ ）。Mn は単純な算術平均の分子量であり、低分子量の存在に影響を受けやすい。また Mw は分子量を重みとして用いた加重平均であり、高分子の存在に影響を受けやすいといわれている。図 2-15 に示した通り、加熱温度 90℃で *B. braunii* から熱水抽出される多糖類のクロマトグラムピークは 14.6 分であり、図 2-14 の検量線の式（ $y = -0.0074 x^3 + 0.3712 x^2 - 6.4639 x + 44.575$ ， y ：分子量（Mw）， x ：溶出時間）から、重平均分子量 Mw は $(2.14 \pm 0.04) \times 10^6$ (n=3)と求められた。また、熱水抽出される *B. braunii* の多糖類の分子量分布指数 Mw/Mn は 2.37 ± 0.05 (n=3)であった。GPC 法で得られる分子量は、あくまで「標準ポリマーであるプルランと同一構造であると仮定した場合の分子量」であり、「プルラン換算分子量」となる。従って、標準ポリマーと測定対象のポリマーの分子構造が大きく異なる場合、真の分子量とのずれは大きくなる可能性がある。また、分子量分布指数 Mw/Mn は分子量分布の広がりを目安となる。通常は $Mn \leq Mw$ であるが、分子量分布のない高分子が単分散している場合は、 $Mn=Mw$ で、Mw/Mn は 1 に近い値となる。以上の結果から、*B. braunii* から熱水抽出される多糖類は、分子量がある程度分散しており、重平均分子量がプルラン換算で約 200 万の高分子量ポリマーであることが示唆された。

一般的に、多糖類は、分子量が高いほど粘性が増すなどの物性変化に関与し、増粘剤やゲル化剤などとして利用用途が多くなる。高分子であるほど、分子鎖を低分子化すること

により、増粘剤、ゲル化剤、結合剤、保水剤など必要な機能性を持つ素材に加工することができる。例えば、アルギン酸の分子量はその海藻の種類などによるが、20-200 万程度であり、フコイダンも同様に由来する海藻により異なるが、ガゴメコンブの平均分子量は 20 万である。いずれも、カルボキシル基 や硫酸基 が結合し、高分子量であることで生理活性作用を持つ。用途に応じて低分子化することで利用可能性を広げてきた。*B. braunii* から熱水抽出された多糖類も、これらの要素を含んでおり、アルギン酸やフコイダンのような機能性素材としての利用可能性が期待される。

表 2-3 *B. braunii* Showa 株から 90℃で熱水抽出された多糖類の化学組成

化学組成	含有量 (%)
炭水化物 (Carbohydrate)	74.3
グルコース (Glucose)	2.7
ガラクトース (Galactose)	38.9
アラビノース (Arabinose)	17.1
マンノース (Mannose)	2.2
ウロン酸 (Uronic Acid)	13.4
窒素 (N)	1.8
硫黄 (S)	0.2
灰分 (Ash)	15.4

表 2-4 *B. braunii* から熱水抽出した多糖類と他の海藻多糖類との化学組成の比較

試料	化学組成 (%)					
	中性糖	フコース	ウロン酸	エステル硫酸	窒素	灰分
熱水抽出された多糖類 (<i>B. braunii</i>)	60.9	—	13.4	0.2 (Sとして)	1.8	15.4
粗フコイダン	20.0	10.0	17.3	20.7	0.7	31.4
アルギン酸ナトリウム	3.2	0.8	27.2	5.8	—	15.2

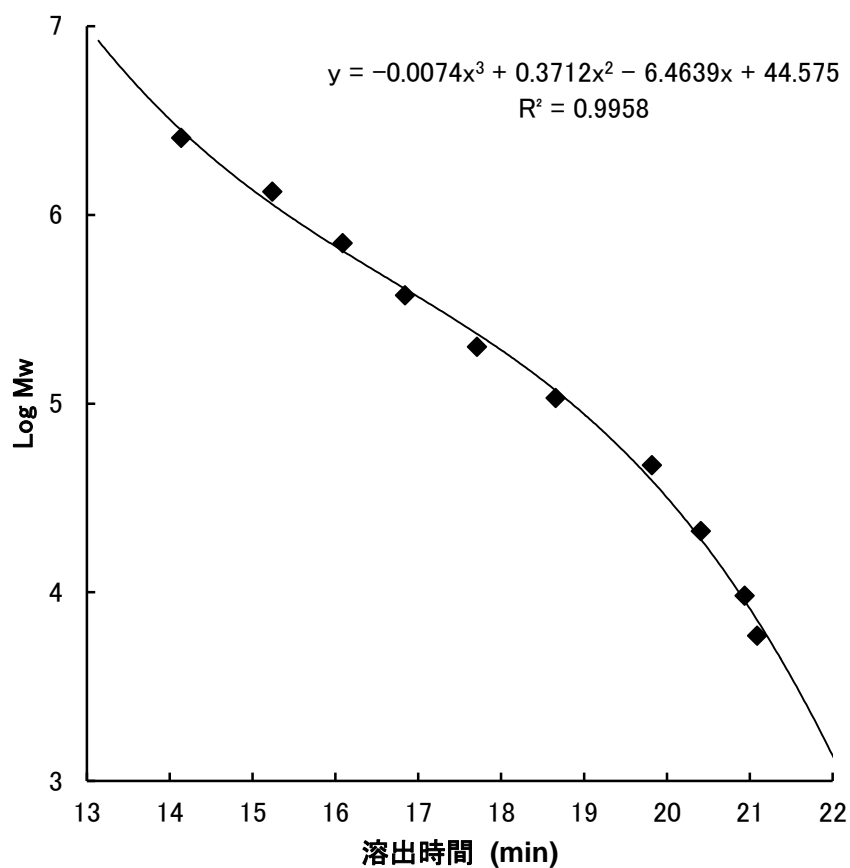


図 2-14 高温 GPC における検量線 (標準物質: プルラン)

標準物質として、分子量既知 (分子量 (Mw) $5.90 \times 10^3 \sim 2.56 \times 10^6$ の 10 点) のプルラン (昭和電工(株)) を採用.

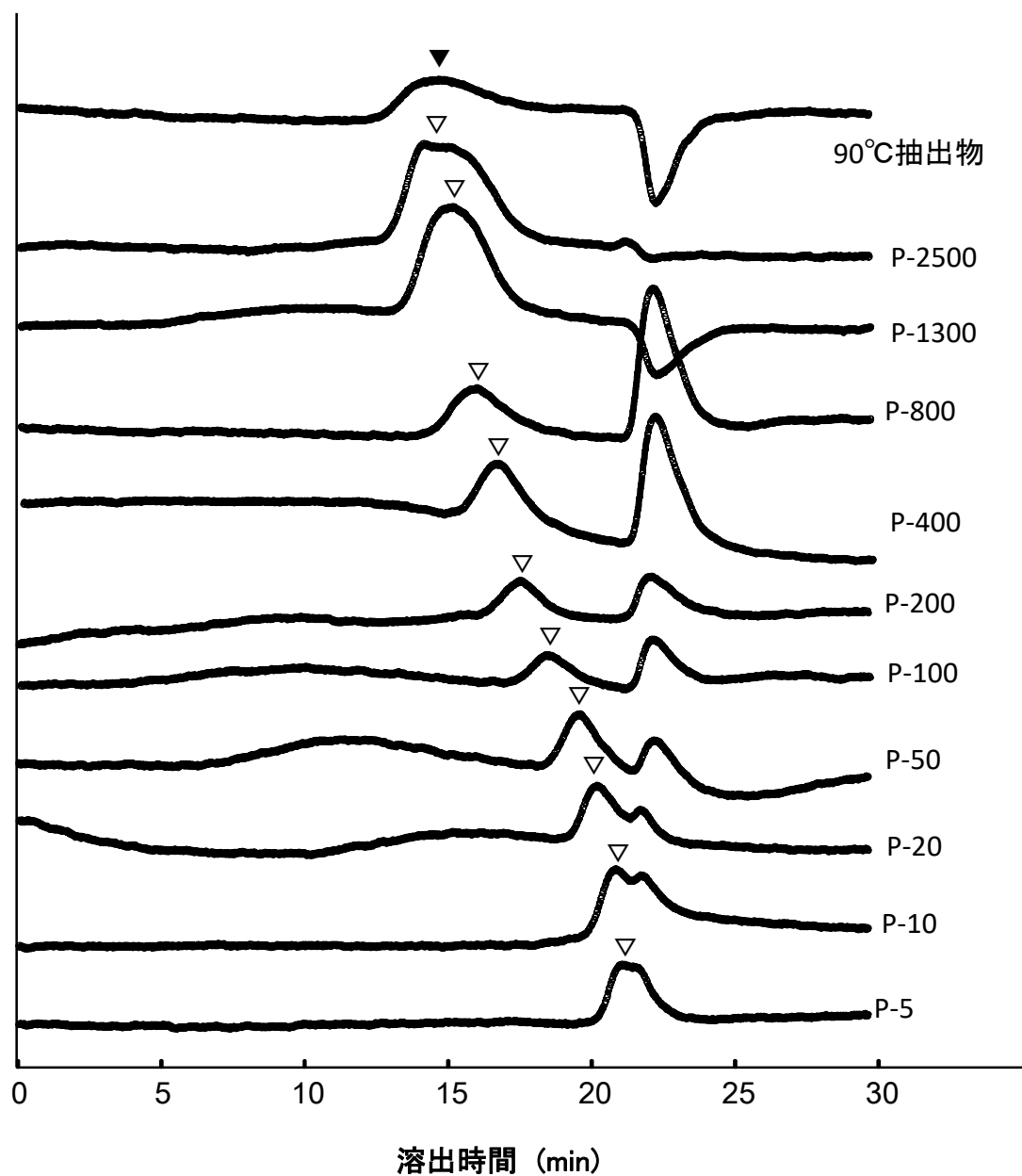


図 2-15 標準プルラン(10 点)と 90°Cで抽出された多糖類のクロマトデータの比較

▽は標準プルランのクロマトグラムのピークトップ、▼は *B. braunii* から熱水抽出された多糖類のクロマトグラムのピークトップを示す。

2.3.3 熱水抽出される多糖類と炭化水素抽出溶媒との相互作用

図 2-16 は、0.5wt%多糖類溶液とヘキサンを体積比 1 : 1 で混合した混合液の乳化する様子を示す。攪拌する前は、0.5 wt%多糖類溶液とヘキサンが 2 相に分離している（図 2-16 (a)）。これを強く攪拌すると乳化した（図 2-16 (b)）。さらに 18 時間放置し、乳化後の経時変化を確認したところ、ヘキサン相はゲル化（硬化）を示した（図 2-16(c)）。多糖類水溶液とヘキサンを攪拌すると、一方の液中に他方が分散し、エマルションを形成した。その後、ヘキサン層が硬化し、多糖類とヘキサンの相互作用が高いことを確認した。

図 2-17 は同試料の粘度の経時変化を示す。攪拌後 2 分が経過した時点から粘度測定を開始した。測定開始時から徐々に粘度が上昇し始め、5 分以降から急激に硬化する様子が見られた。以上の結果から、*B. braunii* から熱水抽出された多糖類は、ヘキサンと強い相互作用を示し、極性の低い有機溶媒と水の系を乳化する両親媒性高分子であることが示された。

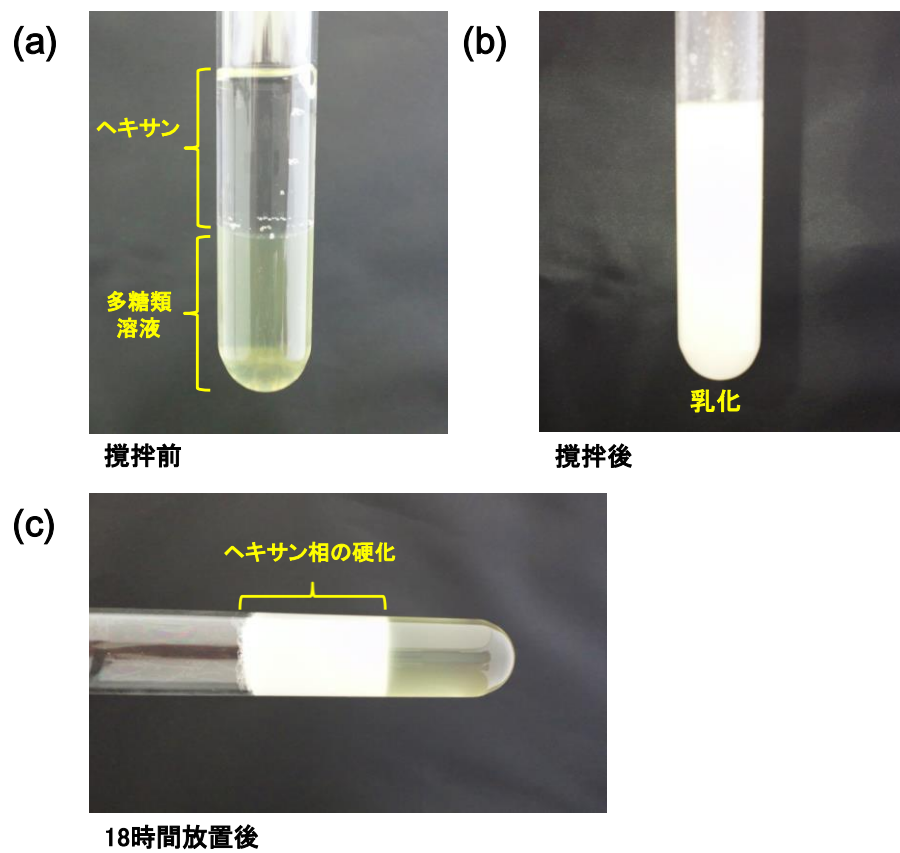


図 2-16 *B. braunii* から熱水抽出した多糖類の 0.5 wt%水溶液とヘキサンの相互作用の様子

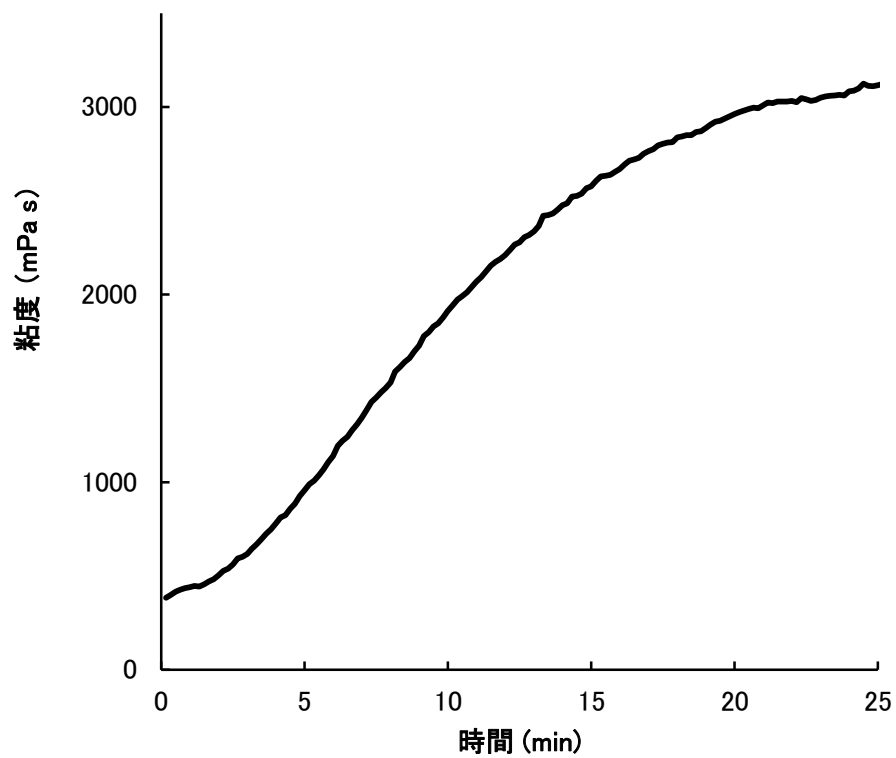


図 2-17 0.5 wt%多糖類水溶液-ヘキサン混合溶液の粘度の経時変化

2.3.4 熱水抽出される多糖類の両親媒特性が炭化水回収率に及ぼす影響

熱水抽出多糖類が藻体スラリーに残存した場合の、藻体からの炭化水素回収に及ぼす影響を調べた。図 2-18 に結果を示す。90℃、10 分間で熱水抽出される多糖類を十分に除去した藻体スラリー（多糖類除去藻体）からの炭化水素回収量 A_0 は $31.2 \text{ wt}\% \pm 0.2 \text{ wt}\%$ ($n=3$) であった。藻体の炭化水素含有量は 2.3.1 項より $33.2 \text{ wt}\% \pm 1.0 \text{ wt}\%$ ($n=3$) だったため、多糖類除去藻体の炭化水素回収率 C_0 は、 $C_0=A_0/B_0$ より $94.1\% \pm 0.6\%$ ($n=3$) であった（図 2-18 中の↓）。この多糖類除去藻体に熱水抽出多糖類の乾燥物を添加し、85%含水の多糖類フリー藻体スラリー 1 g に対して 0、0.05、0.1、0.15、0.2、0.3、0.5、1.0 wt% の多糖類を添加した系、すなわち、乾燥藻体 1g に残存する多糖類の濃度を 0、0.36、0.73、1.09、1.46、2.19、3.65、7.29 wt% と表した系を作成し、それぞれの系から炭化水素を回収したところ、図 2-18 に示されるように、熱水抽出される多糖類の残存濃度が高くなるほど炭化水素回収率が低下した。2.3.1 項で述べたように、熱水抽出される多糖類の重量は、乾燥藻体に対し 9.4% (表 2-2) である。すなわち藻体に残存する熱水抽出可能な多糖類は 9.4% あるといえる。この多糖類の残存量を約 1% にまで除去することで、湿潤な藻体から 85% 以上の炭化水素を回収出来ることを確認した。さらに、残存する多糖類を 0.5% 以下に除去することで、藻体に含まれる 90% 以上の炭化水素を回収出来ることを確認した。

図 2-19 に多糖類除去藻体の炭化水素のクロマトグラムを示す。各ピークの炭化水素の構成成分は、GC-MS (GCMS-QP2010 Ultra; SHIMAZU 社製) 分析による既往の研究で確認されている。Showa 株の属する *B. braunii* B 品種は、 $C_n H_{2n-10}$ ($n=30 \sim 37$) で示される botryococcene 類および methylsqualene 類と呼ばれる分岐型不飽和トリテルペン系炭化水素を生産することが知られており [12, 13]、本測定で用いた *B. braunii* Showa 株から回収された炭化水素の主要ピーク（図 2-19 中ピーク番号 3）は B 品種 Showa 株由来の主要な炭化水素（ C_{34} の botryococcene）であることが確認されている。これら炭化水素は、クラッキングを行うことによってガソリン相当（60~70%）、軽油相当（10~15%）、重油相当（2~8%）、タール分（5~10%）に改質でき [14]、燃料源として有望であると考えられる。

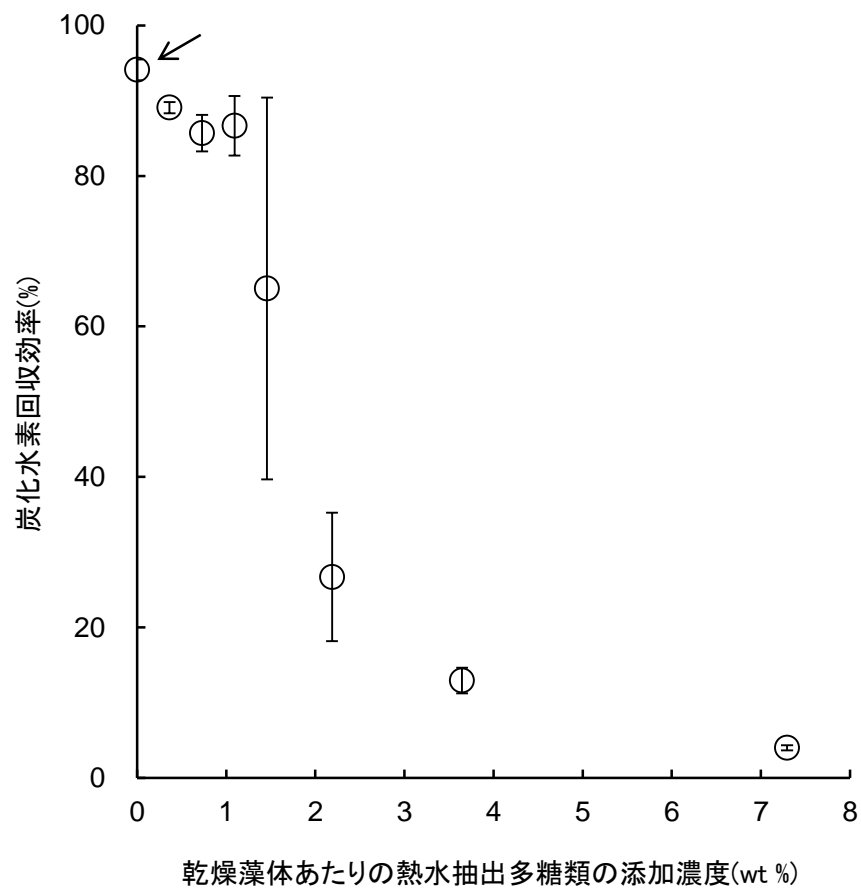


図 2-18 *B. braunii* から熱水抽出される多糖類が *B. braunii* の炭化水素の回収に及ぼす影響

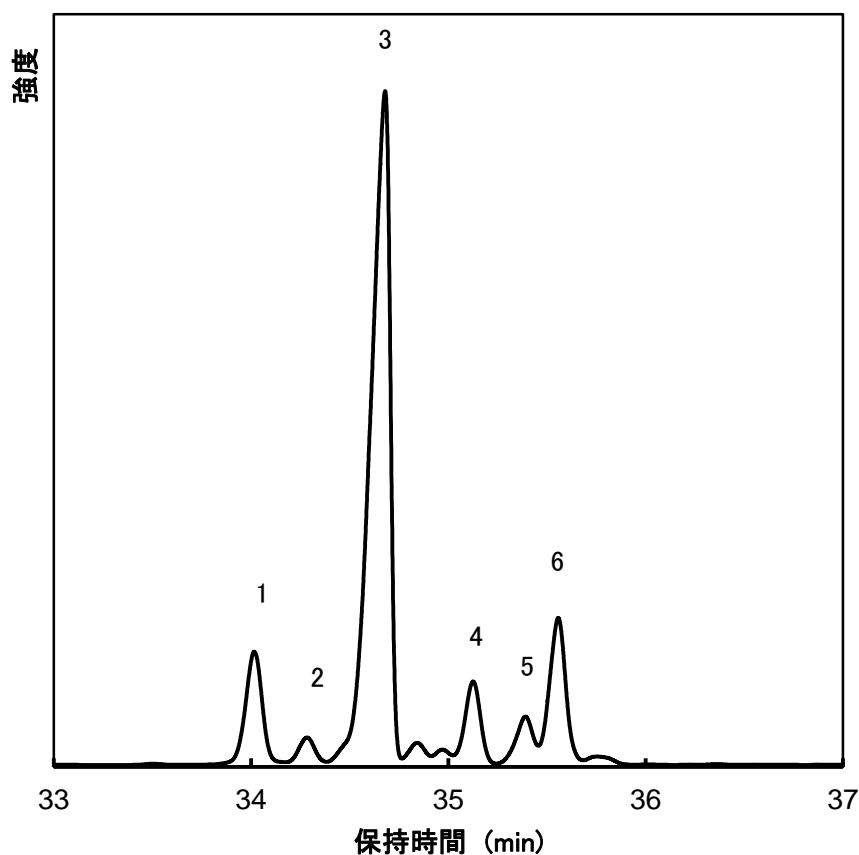


図 2-19 熱水抽出される多糖類を十分に除去した藻体スラリーから回収した
炭化水素のクロマトグラム

2.3.1～2.3.4 の結果から、*B. braunii* から熱水抽出される多糖類は、近年実用化されている多糖類と多くの共通点を持つことが確認された。

カラギーナン、アルギン酸、フコイダンは、実用化されている藻類由来の代表的な多糖類であり、いずれも海藻から熱水抽出された粘質多糖類である。海藻由来の粘質多糖類は、ウロン酸や硫酸糖などの酸性糖を含むことが特徴である。例えばアルギン酸は、 β -マンヌロン酸、 α -L-グルロン酸のウロン酸からなる共重合多糖を含む [15-17]。これら海藻の粘質多糖類は、増粘性やゲル化性の特性を持ち、増粘多糖類やゲル化剤等として利用範囲が広い。*B. braunii* から熱水抽出により得られる多糖類もまた酸性糖を含む粘質多糖類である。

分子量もプルラン換算で 200 万程度であり、分子鎖を低分子化加工することにより機能性素材として利用できる可能性が高い。

また一般的な両親媒性高分子として、アラビアガムが知られている [18-20]。Randall ら (1988)は、*Acacia senegal* 由来のアラビアガムが、ガラクトース約 30%、アラビノース約 20%、ウロン酸約 20%で構成される多糖類で、わずか 2%含有するタンパク質が乳化に寄与していることを明らかにした [21]。表 2-5 に *B. braunii* から熱水抽出された多糖類と *Acacia senegal* 由来のアラビアガムの糖の構成成分の比較を示す。*B. braunii* から熱水抽出される多糖類は、アラビアガムの構成成分と類似していることが示された。*B. braunii* から熱水抽出される多糖類の両親媒性特性は、有機溶媒—水混合系を乳化してヘキサンによる炭化水素の回収を阻害するので、炭化水素生産プロセスで除去する必要がある。しかし、除去すべき多糖類は、他の熱水抽出多糖類と同様に機能性物質として利用できる可能性があることが示唆された。増粘剤や乳化剤として実用的に利用できれば望ましい。

表 2-5 *B. braunii* から熱水抽出された多糖類と *Acacia senegal* 由来のアラビアガムの構成成分の比較

B. braunii から熱水抽出される多糖類は、両親媒性高分子として実用化されているアラビアガムと多糖類の構成糖が類似してる。

試料	多糖類の構成 (%)			タンパク質 (%)
	ガラクトース	アラビノース	ウロン酸	
熱水抽出された多糖類 (<i>B. braunii</i>)	38.9	17.1	13.4	11.25*
アラビアガム (<i>Acacia senegal</i>)	30	20	20	2

* N(窒素)量にタンパク質換算係数 6.25 を乗じた

2.4 まとめ

本章では *B. braunii* から熱水抽出される多糖類が、高濃度藻体スラリーからの炭化水素回収にもたらす影響について検討した。

まず、*B. braunii* から 90℃で熱水抽出される多糖類の組成は、中性糖 60.9%、酸性糖 17.4%により構成される。これらを構成する単糖は、主にガラクトース、アラビノースなどの中性糖、ウロン酸を主とする酸性糖が主成分であり、分子量が約 200 万の高分子であることを確認した。元素分析から、硫黄原子がほとんど含有していなかったことから、酸性糖には硫酸糖の含有がほとんどないことを確認した。また、窒素が 1.8%含有していたことから、熱水抽出される多糖類が N-アセチル-D-グルコサミンや糖タンパク質、あるいはヒアルロン酸のような形態として存在する可能性も示唆された。

次に、*B. braunii* から熱水抽出される多糖類と炭化水素抽出溶媒との相互作用を調べたところ、多糖類は水と有機溶媒を乳化する両親媒特性をもつ高分子であることを確認した。

最後に、熱水抽出可能な多糖類が藻体に残存した場合に炭化水素回収に及ぼす影響を調べたところ、熱水抽出可能な多糖類の藻体に残存する濃度が高くなるほど炭化水素回収率が減少した。藻体には、熱水抽出可能な多糖類が乾燥藻体当たり約 10%含まれていることを確認し、これを乾燥藻体あたり 0.5%以下の濃度にするすることで、藻体に含まれる炭化水素を 90%以上回収出来ることが示された。

以上から、熱水抽出される *B. braunii* 由来の多糖類は、炭化水素抽出溶媒と相互作用を示す両親媒性高分子であり、炭化水素生産プロセスにおいて藻体から除去することで、炭化水素回収が容易になることが明らかになった。

第3章 加熱処理法による *B. braunii* からの炭化水素回収メカニズムの解明

3.1 背景および目的

3.1.1 加熱処理法を用いた *B. braunii* からの炭化水素回収に関する既往の研究

B. braunii の B 品種については、これまでに水熱液化 [1]や加熱処理法 [2]を用いた炭化水素回収方法が報告されている。筆者らも、Kita ら [2]の実験を再現したところ、90℃で藻体スラリーを加熱処理すると、藻体に含有する炭化水素の 95%以上を溶媒回収出来ることを確認した。しかし、80℃以下では炭化水素を殆ど回収できなかった。なぜ 90℃で炭化水素が回収されやすくなるのか、そのメカニズムは不明であった。

一方、*B. braunii* のコロニーは、“retaining wall” と呼ばれるガラクトースとアラビノースを主成分として構成される多糖類の層で囲まれており、炭化水素はこの層の中に保持されているとの報告がある [3]。さらに、生物顕微鏡を用いた観察では、未加熱の藻体コロニーを覆う層の存在が観察された。これに加熱処理を施すと、コロニー表面を覆う層が消失することが確認されている [4]。2 章では、藻体コロニーに加熱処理を施し、*B. braunii* から 90℃で熱水抽出される多糖類の溶出量と化学組成を明らかにした。さらに、熱水抽出される多糖類の両親媒特性を示し、高濃度の藻体スラリーからの炭化水素回収率を向上させるためには、熱水抽出される多糖類を藻体スラリーから除去する必要があることを示した。

3.1.2 本章の目的

以上の研究背景から、*B. braunii* からの炭化水素回収には、藻体スラリーを加熱処理した際に抽出される多糖類が深く関与すると考えられる。本章では、「加熱処理による藻体スラリーからの炭化水素回収」のメカニズムを解明することを目的とし、藻体構成成分の熱分析を行った。*B. braunii* の藻体を構成する成分の特性や機能は、加熱処理によって変化すると考えられる。したがって、炭化水素回収のメカニズムを解明するためには、藻体を構成する成分にもたらす加熱処理の影響を明らかにすることが重要であると思われる。

本章では、高分子の相転移に伴う比熱の変化を測定できる示差走査熱量計（DSC）を用い、藻体スラリーの熱分析を行った。さらに、60℃~90℃の各温度で熱水抽出される多糖類の熱分析、溶出量、組成、分子量の測定を行った。これらの結果をもとに、藻体から熱水抽出される多糖類の熱物性変化と藻体からの炭化水素回収率の関係を示し、考察を加えることを目的とした。

3.2 研究の方法

3.2.1 試料、培養、収穫

第2章と同様、実験には *B. braunii* の B 品種である Showa 株を用いた。藻体の培養には、改変 Chu13 培地を用いた。1200 mL 用ガラス製扁平型培養瓶内でエアリフト培養を行った。室温 25℃、明期暗期 12 時間周期とし、二酸化炭素濃度 1.0% を付加した空気を供給した [5]。培養開始から 30 日経過した培養液を収穫した。詳しい培養方法、収穫方法は 2 章と同様である (2.2.1 参照)。

3.2.2 *B. braunii* の藻体スラリーの熱分析

熱分析は、一定のプログラムに従って試料を加熱または冷却しながら、試料に生じる変化を測定する技法である。代表的な熱分析法には、示差熱分析（DTA）、示差走査熱量測定（DSC）、熱重量測定（TG）、熱機械分析（TMA）、動的粘弾性測定（DMA）などが挙げられるが、本研究では、常温から 100℃までの高分子の相転移を測定するのに有用な DSC を用いることにした。

示差走査熱量計（Differential Scanning Calorimeter, 以下 DSC）は、温度差に起因するエネルギー移動である「熱」を対象とし、物質からの熱の出入りに注目する熱分析技法の一つである。DSC は、一定の熱を与えながら、温度によって熱容量が変化しない基準物質と、実験に用いる試料の二つの温度を測定して、試料の熱物性を温度差として捉え、試料の状態変化による吸熱反応や発熱反応を測定する装置である。DSC によって得られる記録が DSC 曲線であり、試料と基準物質へのエネルギー入力之差として、両者間の温度差に基づく熱流束の差を縦軸に、温度または時間を横軸にとりて表示する。DSC 曲線から、結晶化（発熱ピーク）、溶融（吸熱ピーク）のような単純な熱による状態変化の反応だけでなく、タンパク質の変性や糖のゾルゲル転移、あるいは炭水化物の糊化などの現象をとらえることができ、生体高分子や食品の安定性の評価に広く利用されている [6]。本研究では、マイクロ熱量測定（ μ DSC-7, SETARAM Instrumentation）を使用した。汎用の DSC は試料容器の底面の情報を検出するのに対し、 μ DSC-7 は試料容器の底面だけでなく側面を含めた三次元情報を検出するため、汎用型 DSC に比べ超高感度な測定が可能となる。 μ DSC-7 の外観を図 3-1 に、基準物質と測定試料を投入するセルを図 3-2 に示す [7]。

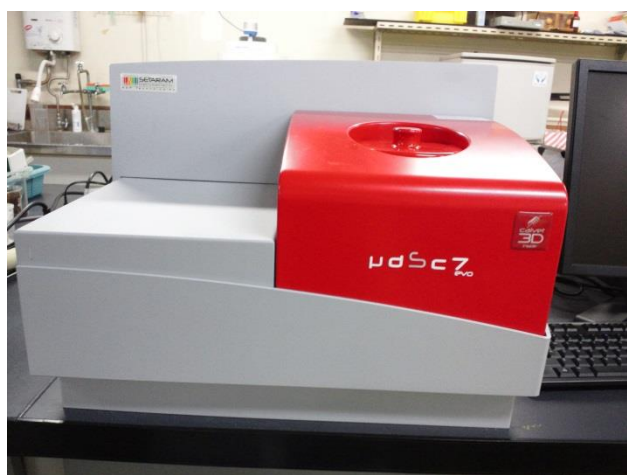


図 3-1 *B. braunii* の藻体スラリーの熱分析に用いた SETRAM 社製の μ DSC-7



図 3-2 *B. braunii* の藻体スラリーの熱分析に用いた μ DSC-7 用 Hastelloy 製セル [7] 改変

DSC 測定では、初めに藻体スラリーを 50 g L^{-1} に調整し、調整したスラリー 800 mg をハステロイ製セルに密閉後、昇温速度 1°C min^{-1} で 25°C から 100°C まで昇温させた。3 章における測定フローのうち、藻体スラリーの熱分析のフローを図 3-3 の太字に示す。

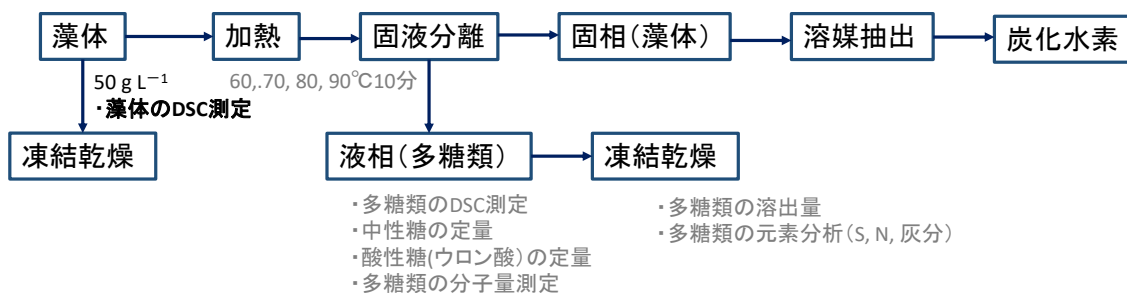


図 3-3 藻体スラリーの熱分析の実験フロー

3.2.3 異なる温度で熱水抽出される多糖類の溶出量と組成分析

60℃、70℃、80℃、90℃の異なる温度で熱水抽出される多糖類の溶出量と組成分析を次の手順で行った。まず 50 g L^{-1} に調整した藻体スラリーを 10 mL ずつ遠心チューブに分注し、加熱処理を行った。加熱処理は、ウォーターバス（HWA-50, アズワン株式会社）を用い所定温度（60～90℃）で 10 分間行い、藻体スラリーから多糖類を熱水抽出した。3 章における実験フローのうち、多糖類の溶出量と組成分析を図 3-4 の太字に示す。多糖類の溶出量の定量と組成分析はそれぞれ 2.2.2 と 2.2.3 と同様に行った。

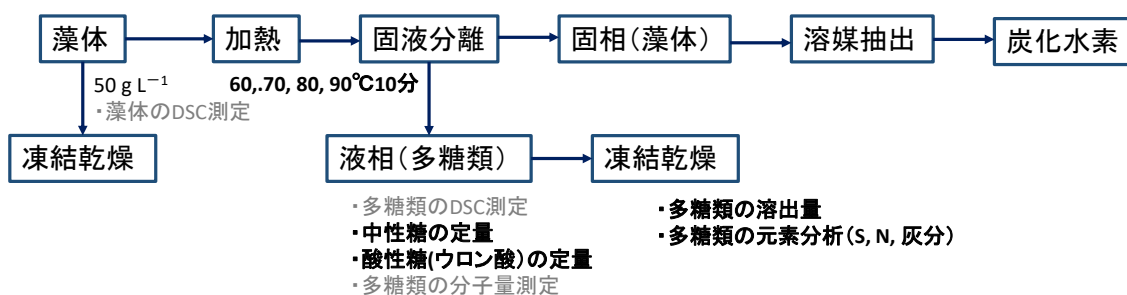


図 3-4 熱水抽出される多糖類の溶出量と組成分析の実験フロー

3.2.4 異なる温度で熱水抽出される多糖類の熱分析

60℃、70℃、80℃、90℃の異なる温度で熱水抽出される多糖類の熱分析を行った。2.2と同様に μ DSC-7 を使い、それぞれの温度で熱水抽出された液相 (3.2.3 参照) 800 mg を、ハステロイ製セルに入れ密閉後、25℃から 80℃ (昇温速度 1℃ min⁻¹) まで昇温させた。3 章の測定フローにおける藻体から熱水抽出される多糖類の熱分析を図 3-5 中の太字に示す。

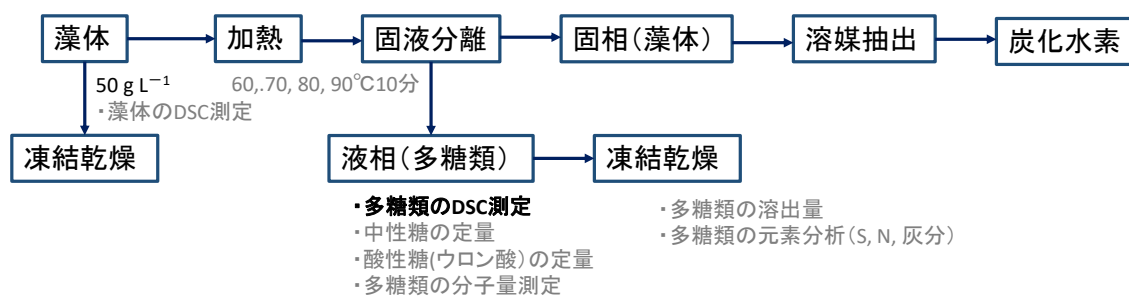


図 3-5 熱水抽出される多糖類の熱分析の実験フロー

3.2.5 熱水抽出される多糖類のゾル状態における炭化水素回収率測定

これまでの、*B. braunii* の加熱による炭化水素回収実験では、加熱処理後の藻体を常温に戻してから炭化水素を溶媒回収してきた。しかし、加熱処理によって藻体スラリーから溶出する多糖類は、常温状態と加熱状態で異なり、常温に戻す冷却過程で状態変化を起こす可能性がある。したがって、藻体スラリーから炭化水素を回収するメカニズムを解明するには、加熱処理直後と常温に戻した後での炭化水素回収率の違いを確認する必要がある。そこで、加熱処理温度を維持した状態（60～90℃）と常温（25℃）の双方において、炭化水素の溶媒回収を行い、多糖類の物性変化が炭化水素回収に及ぼす影響を調べた。炭化水素回収の実験フローを図 3-6 に示す。

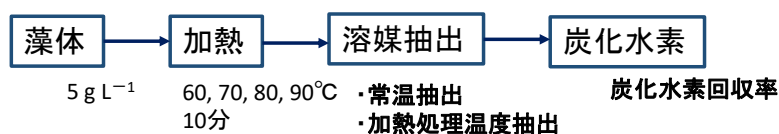


図 3-6 各加熱処理温度における炭化水素回収の実験フロー

実用的には、高濃度の藻体スラリーから少量の有機溶媒で炭化水素を回収することが望ましいが、本実験では藻体濃度を 5 g L^{-1} と比較的薄い濃度に調整して試料とした。低濃度の藻体スラリーを多量の有機溶媒で抽出することで、炭化水素の回収量をより効果的に測定できるからである。試料をガラス瓶に分注し、ウォーターバス(HWA-50, アズワン株式会社)を用い所定温度（60～90℃）で 10 分間加熱した。加熱処理容器内の藻体溶液の温度を試料中心部に挿入した温度計を用いて測定した。また、70℃から 90℃の温度帯で揮発の影響を受けない *n*-デカン（以下、デカン）を溶媒として用いた。以下、①に加熱処理を維持した状態で炭化水素を回収する方法（以下、加熱処理温度抽出）を、②に常温で炭化水素を回収する方法（以下、常温抽出）を示す。

- ① 加熱処理温度抽出では、所定温度（60～90℃）で加熱処理した試料 1 mL をガラス製試験管に分注し、加熱処理温度を維持した状態で、所定温度（60～90℃）に昇温させたデカンを 5 mL 注入し、30 秒間振とうさせた。振とう後、試験管を再び所定温度（60～90℃）まで昇温させ、再度 30 秒間振とうさせた。このデカン 5 mL を注入し昇温させ 30 秒間振とうする操作を 3 回繰り返した後に、遠心分離（LC-200, 3650 ×g, 10 min, 株式会社トミー精工）により炭化水素を含有するデカン相を分離した。
- ② 常温抽出では、従来通り所定温度（60～90℃）で加熱処理後の試料 1 mL をガラス製試験管に分注し、常温に戻し、常温のデカンを注入した。その後①と同様の操作を行った。

各抽出条件での炭化水素の回収率は、ガスクロマトグラフィー（Gas Chromatography, GC）により測定した。GC の仕様や測定条件、炭化水素回収率の算出方法は、2.2.6 と同様である。90℃で加熱処理を施した藻体スラリーからの常温抽出で、炭化水素をほぼ 100% 回収出来ることから、この時の GC クロマトグラムの C_{34b} botyococcene のピーク面積（D_{90r} とする、2.2.6 参照）を炭化水素回収率 100% とした。各条件における C_{34b} botyococcene のピーク面積 D_{60r}、D_{70r}、D_{80r}、D_{60t}、D_{70t}、D_{80t}、D_{90t} を測定し、D_{90r} との比を炭化水素回収率とした。D の添え字で、数字は加熱処理温度を、r は常温抽出を、t は加熱処理温度での抽出を示す。

3.2.6 異なる温度で熱水抽出される多糖類の分子量測定

70℃、80℃、90℃の異なる温度で熱水抽出される多糖類の分子量を2章と同様の方法で測定した。分析条件も同様である(2.2.4 参照)。3章の実験フローにおいて、藻体スラリーから異なる温度で熱水抽出された多糖類の分子量測定を図3-7中に太字で示す。

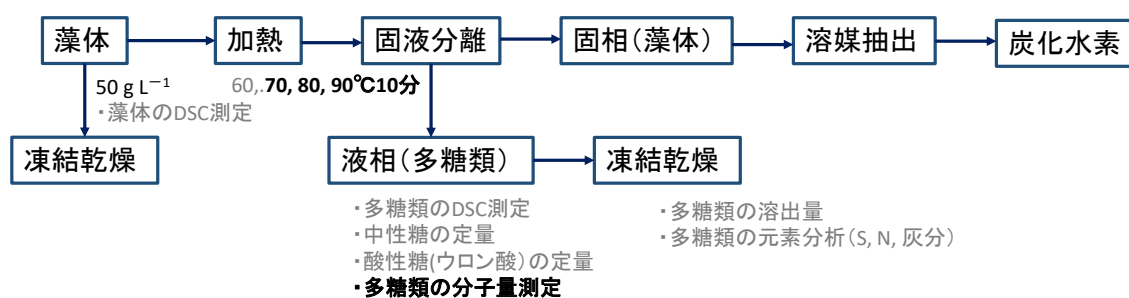


図 3-7 異なる温度で藻体から熱水抽出される多糖類の分子量測定の実験フロー

3.3 結果および考察

3.3.1 藻体スラリーのタンパク質の熱変性

DSC 測定は、試料と基準物質を温度プログラムに従って昇温させ、試料と基準物質に設置した熱電対でそれぞれの温度を計測し、熱流量（熱容量）差を測定する。したがって、DSC 曲線は、横軸は温度、縦軸が熱流量であり、ピーク面積が熱量（エンタルピー変化）に精度よく換算できる。縦軸の熱流量は、基準物質－試料間に流れる熱流量差を DSC 信号（mW）としてプロットするため絶対量を示すものではない。図 3-8 に *B. braunii* 藻体スラリー（50g L⁻¹）の DSC 曲線を示す。開始温度 56.3 ± 5.0°C（図中の矢頭）、ピーク温度 63.5 ± 0.7°C（±S.D. n=3）（図中の矢印）とする吸熱ピークが確認された。図 3-8 で得られた吸熱ピークの原因を検証するために、1 回目に昇温（1st run）させた藻体スラリーを冷却して 2 回目の昇温（2nd run）測定を行った。結果を図 3-9 に示す。1st run では吸熱ピークが検出され、2nd run ではピークが検出されなかったことから、*B. braunii* の藻体スラリーは昇温過程で不可逆的な変化を起こしていることが明らかとなった。

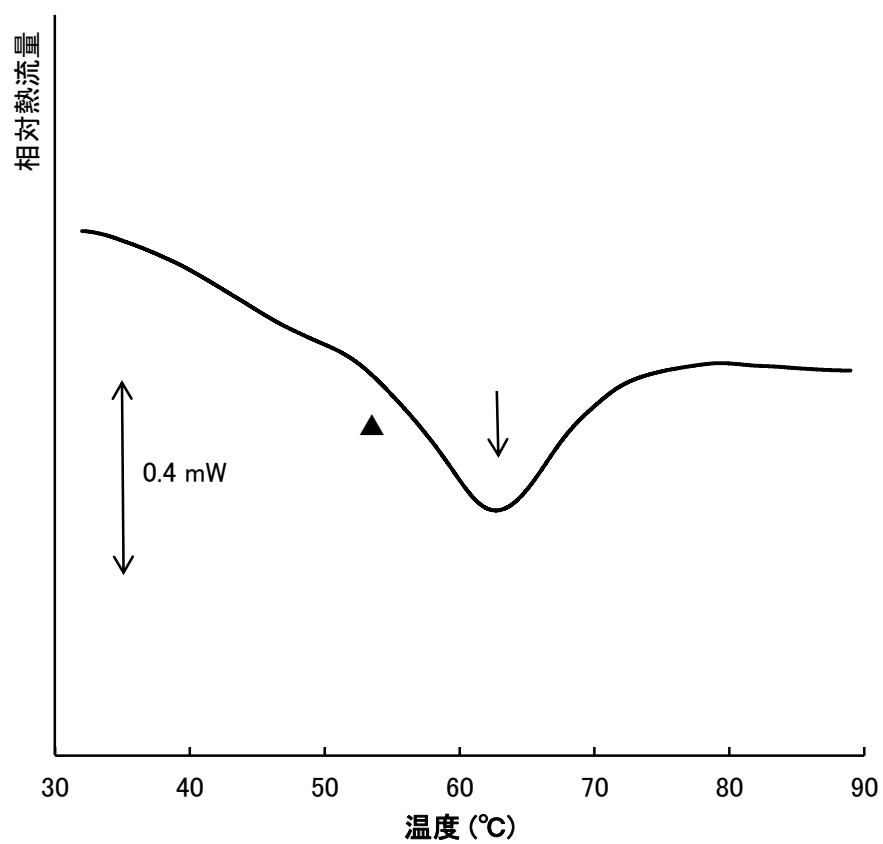


図 3-8 50 g L⁻¹ *Botryococcus braunii* Showa 株 の藻体スラリーを DSC 測定により昇温速度
1°C min⁻¹で測定し得た DSC 曲線

相転移開始温度(▲)および相転移点(↓)とする吸熱ピーク

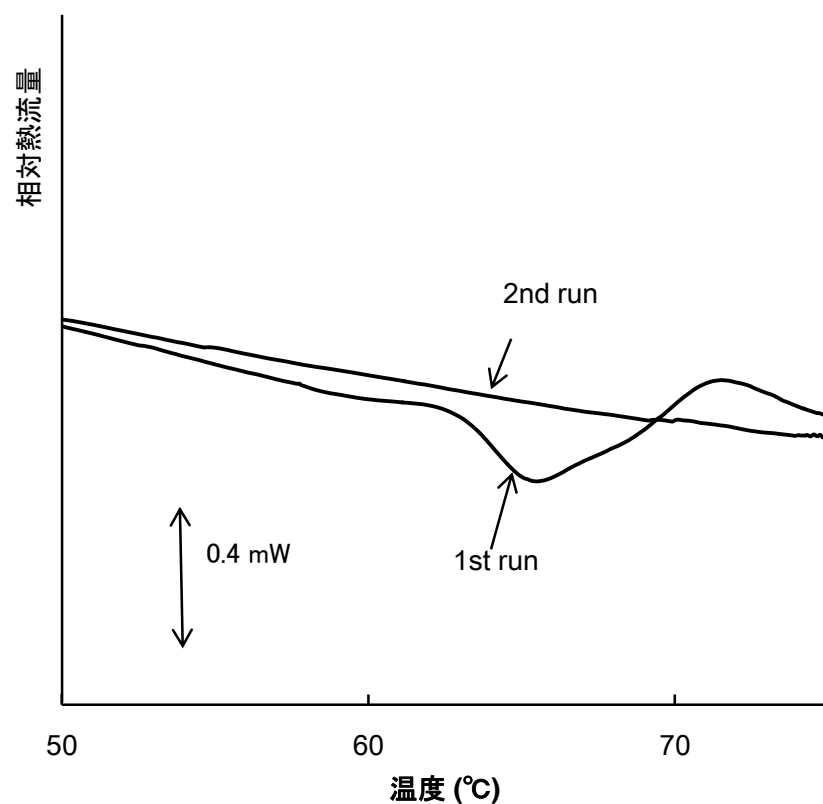


図 3-9 藻体スラリーを 50 g L^{-1} に調製し、昇温速度 1°C min^{-1} で DSC 測定し得た 2nd run の DSC 曲線

従来から DSC 法は、食品や生体高分子におけるタンパク質の変性の判定に用いられてきた。生体や食品を構成する高分子（タンパク質、脂質、多糖類など）の中で、タンパク質は、加熱によりヘリックスやシートが折りたたまった立体構造が壊れ、天然状態から変性状態へと不可逆的に相転移する。この結果として、DSC 曲線で吸熱ピークが検出される。しかし、タンパク質の変性は不可逆的な状態変化であることから、同じサンプルを冷却して再び昇温させた 2nd run では、吸熱ピークが生じない。一方で脂質や多糖類の場合、昇温過程や冷却過程において、高分子の融解や凝集、ゾルゲル反応などの可逆的な転移がみられるのが特徴である。既往の研究において、*B. braunii* のタンパク質は、藻体の乾燥重量の約 15% であると報告されている [8, 9]。2 章において、*B. braunii* の乾燥重量のうち 33.2%

が炭化水素、9.4%が熱水抽出多糖類であることが確認されたことから、*B. braunii*に占めるタンパク質の約15%という割合は少なくはない。本測定で得られた吸熱ピークは、不可逆的な変性を起こしていること、また、一般的なタンパク質は60℃より高温で変性すること、さらに、*B. braunii*に占めるタンパク質の割合が多いことから、藻体を構成するタンパク質変性に起因する変性ピークであることが示唆された。

以上の結果と考察から、藻体を構成するタンパク質は約64℃で変性することが示唆された。本研究では、藻体コロニーを構成するタンパク質の構成成分が同定されておらず、本実験のような*B. braunii*のタンパク質の熱変性温度を測定した研究例がないため、本実験結果と既往のデータとの比較はできなかった。本実験で確認された吸熱ピークは、藻体を構成する複数のタンパク質の熱変性ピークが重なったものであることも考えられる。構成タンパク質の詳細を明らかにするには、DSCの昇温速度を遅くしたり、あるいは天然状態のタンパク質の構造安定性を明らかにするために、藻体構成タンパク質の変性温度に対する藻体スラリーの水分依存性の検討などを行う必要がある。しかし、本研究ではタンパク質について、これ以上の詳細な検討は行わなかった。

1章で述べたように、*B. braunii* Showa 株の炭化水素回収率が急激に上昇する温度帯は、85℃付近である。本章で測定されたDSC曲線では、64℃でタンパク質の吸熱ピークを検出した後、85℃の温度帯には目立ったピークは確認されなかったことから、タンパク質が炭化水素回収の直接的な要因ではないことが示唆された。しかし、藻体スラリーを構成するタンパク質の変性後に、多糖類が熱水抽出されることが確認された。図3-10は、50 g L⁻¹の藻体スラリーを各温度で加熱処理した後に遠心分離（LC-200, 3650 ×g, 10 min, 株式会社トミー精工）した様子を示す。遠心分離後の固相（上層）は藻体、液相（下層）は藻体から熱水抽出された多糖類の相である。50 g L⁻¹の高濃度の藻体スラリーでは、未加熱および60℃の加熱処理後に遠心分離しても、藻体が液相に混入しやすく十分に分離できない。しかし、タンパク質変性温度(64℃)よりも高い70℃以上で加熱処理すると、遠心分離後、多糖類が含まれる液相が分離しやすくなり、90℃以上では藻体の液相への混入がなくなり顕著に分離できる。このことから*B. braunii*の昇温過程におけるタンパク質の変性は、結果的に藻体構成成分の立体構造に変化をもたらし、多糖類のような藻体を取り巻く水溶性物質を溶出させたと考えられる。一般に細胞組織は、構成するタンパク質が変性すると

保水能力が低下し、細胞間隙の水溶性成分が溶出されている [10]。このことから、藻体タンパク質の変性後に多糖類が熱水抽出されやすくなることが裏付けられる。本研究では、これら熱水抽出される多糖類が加熱処理による炭化水素回収効率に影響を及ぼすと考えた。そこで次項では、異なる温度で熱水抽出される多糖類の解析を行った。

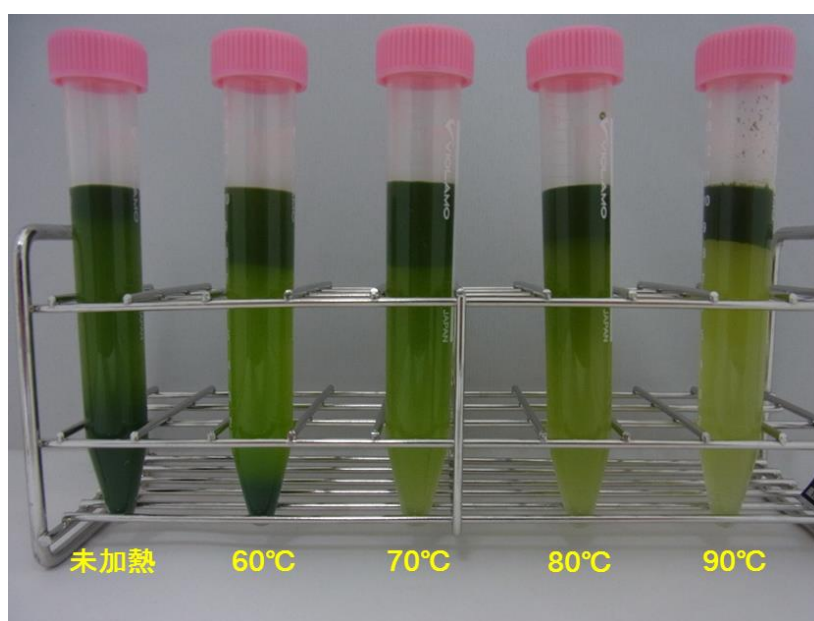


図 3-10 異なる加熱温度において藻体スラリーから多糖類が熱水抽出される様子

3.3.2 異なる温度で熱水抽出される多糖類の溶出量と組成変化

B. braunii Showa 株 50 g L^{-1} の藻体スラリーを所定の温度 ($60^{\circ}\text{C}\sim 90^{\circ}\text{C}$) で加熱処理し、遠心分離したところ、多糖類が抽出された。抽出された多糖類の溶出量を図 3-11 に示す。エラーバーは3回繰り返し行った結果の標準偏差を示す。乾燥藻体重量当たりの多糖類の溶出量は、熱水抽出温度 60°C で約 7% (74.1 mg g^{-1} 乾燥藻体) であった。さらに熱水抽出温度を高くすると、藻体からの多糖類の溶出量は、徐々に増え、 90°C で約 9% (93.5 mg g^{-1} 乾燥藻体) であった。

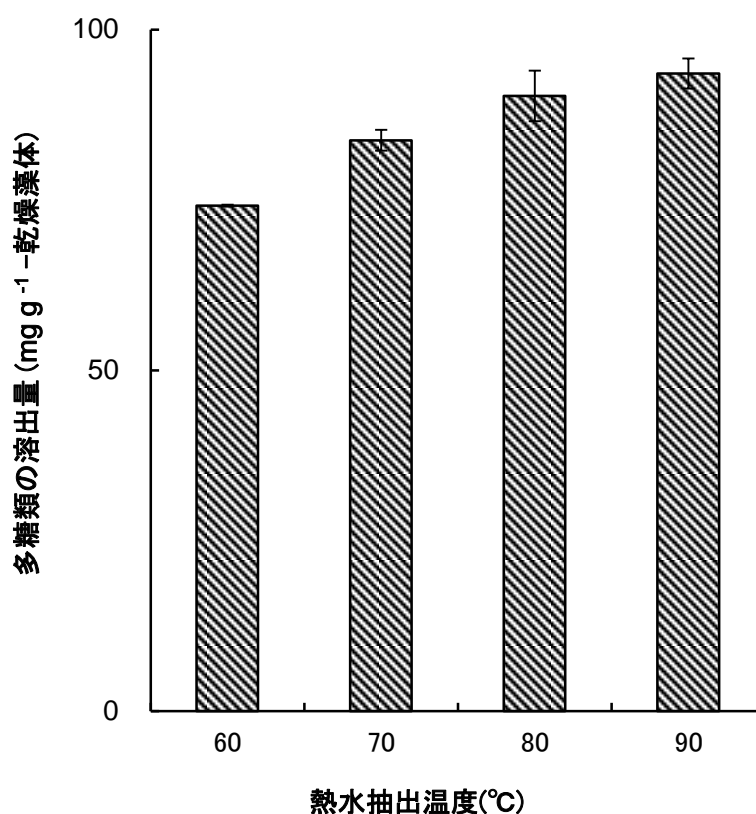


図 3-11 *B. braunii* Showa 株の藻体スラリーから熱水抽出される多糖類の溶出量

次に、同試料の異なる温度で熱水抽出された多糖類の組成を表 3-1 に示す。数値は 3 回繰り返し行った結果の平均値である。多糖類は、いずれの熱水抽出温度でも、中性糖および酸性糖で構成されることが明らかになった。中性糖と酸性糖の合計量は、抽出温度を上げていくと徐々に上昇したが、抽出温度 80℃以上で、糖類の構成は変化しなかった。また、いずれの抽出温度においても硫黄の量は非常に少なかったことから、硫酸基を含む糖類は含有されないことが示された。さらに、元素分析による窒素量から換算されるタンパク質量は、60℃では 14%であったが、70℃以上では 11%で横ばいになった。これは藻体を構成するタンパク質の変性温度（3.3.1 から 64℃）に起因すると考えられる。

表 3-1 *B. braunii* Showa 株から異なる温度で熱水抽出される多糖類の化学組成

熱水抽出温度 (°C)	炭水化物 (%)		タンパク質 (%) **	S (%) ***	灰分 (%)
	中性糖	酸性糖 *			
60	51.1	10.2	14.4	0.26	17.5
70	53.0	12.8	11.3	0.22	16.4
80	62.2	13.5	11.3	0.23	15.2
90	60.9	13.4	11.3	0.20	15.4

* カルボキシル基($-\text{COO}^-$)を持つ酸性糖

** 窒素-タンパク質換算係数6.25を使用

*** 硫酸糖($-\text{SO}_4^-$)の有無を調査するために測定

さらに、図 3-12 に熱水抽出された多糖類の構成単糖を示す。これは3回繰り返し行った結果の平均値である。70°C以上で、多糖類を占める構成単糖のうちガラクトース、アラビノース、ウロン酸が増加し、グルコース、マンノースが減少した。この結果は、タンパク質の変性温度を境に、熱水抽出される多糖類の組成が変化することを示している。以上の結果から、タンパク質の変性温度よりも高い温度、すなわち70°C以上で熱水抽出される多糖類は、ガラクトース、アラビノースおよびウロン酸を主とする単糖類で構成されていることが明らかになった。

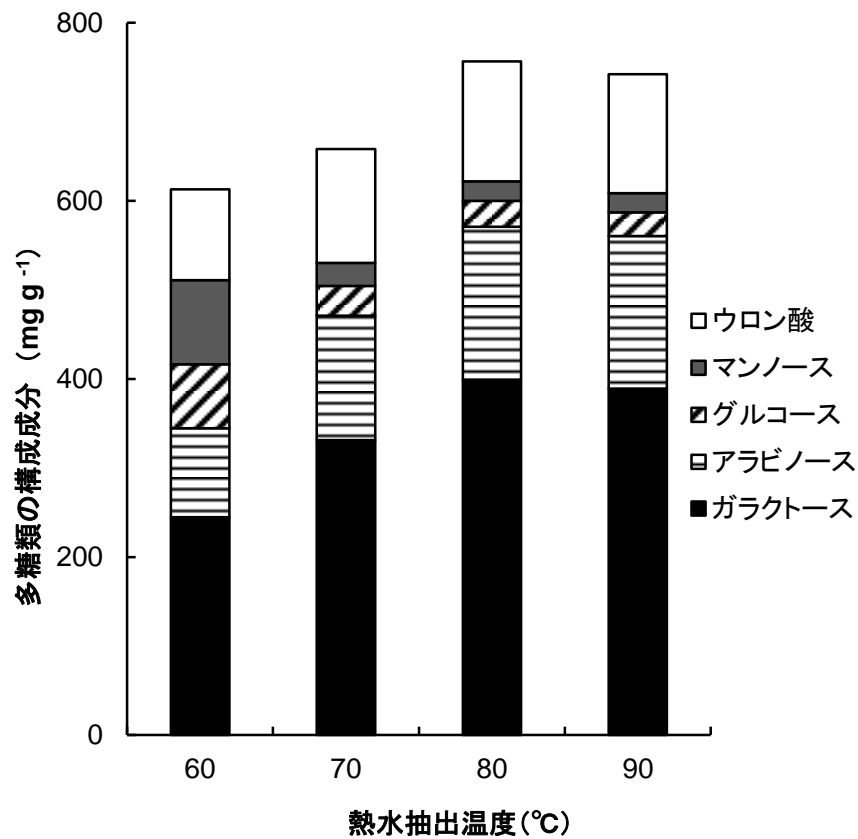


図 3-12 *B. braunii* から熱水抽出される多糖類の構成糖

研究背景で述べたように、*B. braunii* より生産される炭化水素は細胞内ではなく、細胞外の ECM 部に蓄積する。ECM を含むコロニー表面は retaining wall と colony sheath の繊維状物質で覆われていると考えられている。Weiss ら [3] は、培養中にコロニーから外れ放出される “colony sheath” の赤色部分のキャップの組成を調べたところ 8 割がガラクトース、アラビノースであったと報告している。このことから、熱水抽出される多糖類は、コロニーの周りを覆う “colony sheath” を含んでいる可能性が高いと考えられる。加熱により、繊維状物質が外れ、抽出溶媒と炭化水素の接触が可能になったことが示唆された。

3.3.3 異なる温度で熱水抽出される多糖類の熱物性変化

異なる温度で熱水抽出される多糖類の熱分析の DSC 曲線を図 3-13 に示す。DSC 曲線の縦軸の熱流量は、基準物質－試料間に流れる熱流量差を DSC 信号 (mW) としてプロットするため絶対量を示すものではない。したがって、縦軸の絶対値は意味を持たず、わかりやすいように (1) から (4) の DSC 曲線をずらして一つの図中に表示した。70℃および 80℃で熱水抽出された多糖類の DSC 曲線は吸熱ピークを示した。しかし、60℃および 90℃で熱水抽出された多糖類の DSC 曲線は、吸熱ピークを示さなかった。

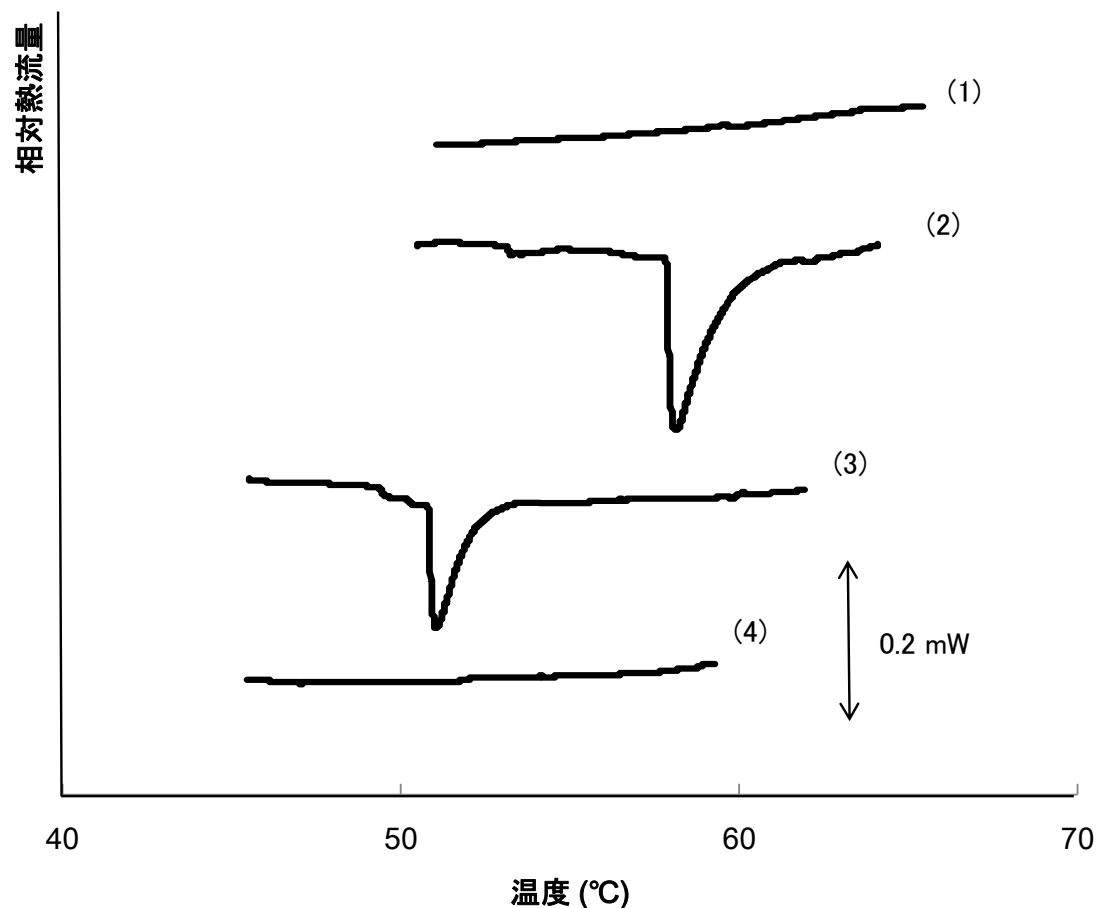


図 3-13 異なる温度で熱水抽出された多糖類の DSC 曲線

DSC 測定は、昇温速度 $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で行った。測定試料は (1) 90°C ; (2) 80°C ; (3) 70°C ; (4) 60°C で藻体から熱水抽出された多糖類

一般に藻類は、細胞間に粘質多糖類を充填していることが古くから知られている [11-13]。海藻から抽出される多糖類は、ゲル化性、増粘性、安定性、分散作用があるため、食品分野や医薬品分野で幅広く応用されている [14-16]。特に、寒天やカラギーナン、アルギン酸などの代表的な多糖類は、いずれも海藻類から熱水抽出される [17-19]。これら海藻類より熱水抽出される多糖類は、冷却過程において、ウロン酸のカルボキシル基や硫酸糖のスルホ基を持つ分子差が架橋形成する役割を果たし、ゲルを形成する。また、再び加熱するこ

とにより分子鎖の架橋が切れゾル状態に戻る、可逆的なゾルゲル転移を起こす。従来より DSC 測定でゾルゲル転移を確認することで、その判定が行われてきた [20]。図 3-14 に、提唱されているゲル化モデルを示す [21]。

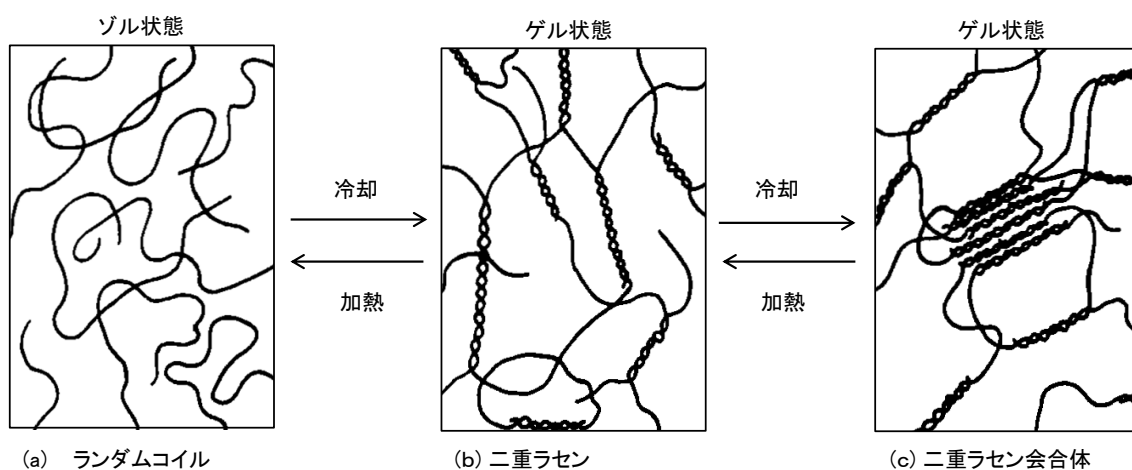


図 3-14 高分子のゲル化のモデル [21]

- (a) 高分子がランダムコイル状態として存在(ゾル状態)
- (b) 2 本ずつ絡み合って部分的に二重らせん(double helix)を形成して、架橋部分を形成している(ゲル状態)
- (c) 二重らせんが凝集して二重らせん会合体(superjunction)を形成している(一層強固なゲル状態)

高分子溶液がゲル化を起こすには、高分子間に何らかの架橋が生じて、3次元のネットワークが発達する必要がある。このゲル化のメカニズムを架橋の性質から、図 3-14 (a)~図 3-14 (c)のように分類できる。カラギーナン等に見られるように、ゾル中でランダムコイルであった糸状高分子図 3-14 (a)は、2 本ずつ絡み合って部分的に二重らせん(double helix)を形成して、架橋部分を形成しゲル化する図 3-14 (b)。これらの高分子は DNA のような厳密な規則性がないので、ヘリックスの途中でしばしば“もつれ(kinks)”を生じ、そのため

に3次元ネットワークを作りやすい。さらに、この二重らせんが凝集して二重らせん会合体(superjunction)を形成し、一層強固なゲル状態になることがある(図 3-14 (c))。二重らせん会合体は、アガロースや低硫酸カラギーナンなどに見られる [10]。表 2-4 に示したように、アルギン酸やフコイダンにはそれらの熱水抽出物中にウロン酸やエステル硫酸を含有し、カルボキシル基(COO⁻)あるいは硫酸基(SO₃⁻)から二重らせんを生じやすい。以上の知見から、カルボキシル基を持つ *B. braunii* の多糖類の DSC 曲線の吸熱ピークは、ゾルゲル転移に起因するものであると考えられる。このゲル化の解析は、DSC 測定において、1 回目の昇温過程(1st run)でゾル化した試料は、冷却するとゲル化し、2 回目の昇温過程(2nd run)で再びゾル化することで、2nd run の DSC 曲線においても吸熱ピークを示す。そこで本研究において、80℃で熱水抽出した試料を 1st run 後に冷却し、2nd run を行ったところ、2nd run の DSC 曲線から、再び吸熱ピークが検出されることを確認した(図 3-15)。今回の結果は、吸熱ピークの大きさに差が生じ、融解温度にもずれが生じた。これは、2nd run の昇温前の冷却過程において、1st run の昇温前と同じゲル状態を作ることが困難であったためと考えられる。もしも、1st run と 2nd run の昇温前に全く同じ形でゲルが形成されていれば、同じ温度で同じ大きさの吸熱ピークが見られたはずである。本実験では、2nd run に再び吸熱ピークが現れたことから、80℃で熱水抽出した多糖類の吸熱ピークは、ゾルゲル転移を示すことを確認した。70℃で熱水抽出された多糖類の吸熱ピークについても、同様の転移が起きていると思われるが確認は行わなかった。一方、60℃および90℃で熱水抽出した多糖類はゾルゲル転移を示さないことが示唆された。

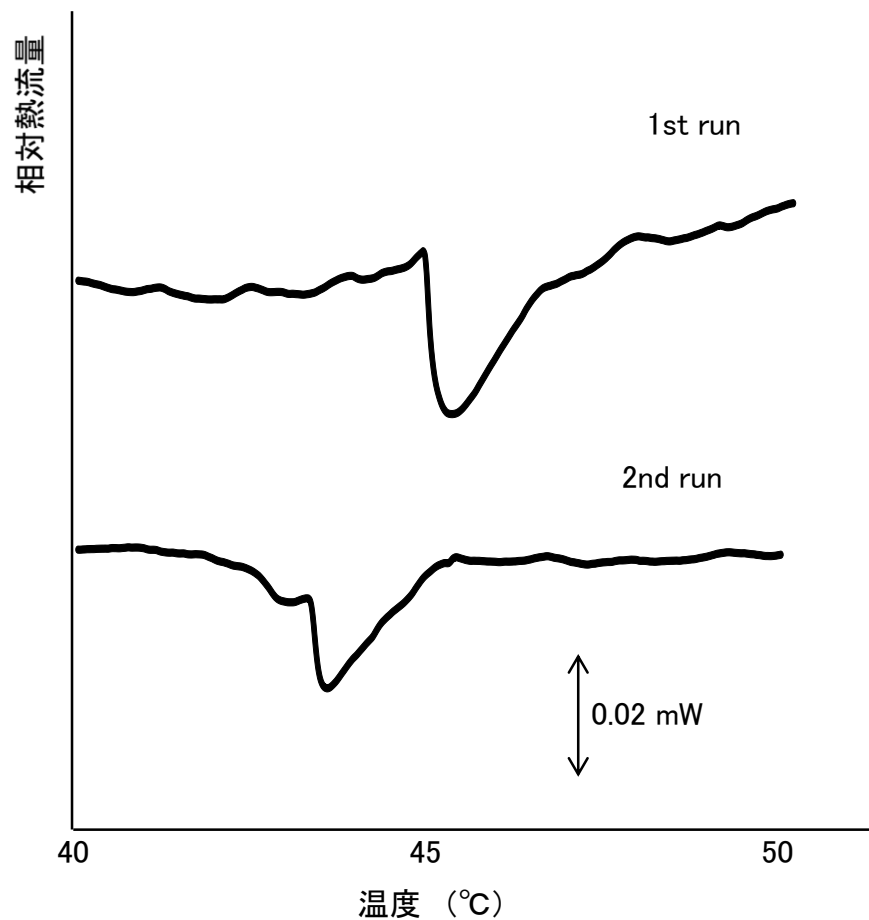


図 3-15 80°Cで *B. braunii* から熱水抽出される多糖類の DSC 曲線

以上の結果まとめると、まず *B. braunii* の藻体スラリーを加熱すると、タンパク質は 64°C で変性する。次に、タンパク質変性温度以上の 70°C および 80°C で藻体から熱水抽出される多糖類は、ゾルゲル転移を示す。しかし、90°C で熱水抽出される多糖類は、ゾルゲル転移を示さない。この結果から、70°C および 80°C で溶出する多糖類は、常温に戻る過程でゲル化し藻体の周りに再付着して炭化水素の回収を阻害することが示唆された。一方、90°C で加熱処理された多糖類は、ゲル化能をもたず、藻体の周りに再付着しにくいので、有機溶媒が藻体に含有する炭化水素と接触でき、炭化水素が藻体から容易に回収できることが示唆された。この考察を検証するため、次節 3.3.4 では、加熱処理温度を保持することで、藻

体に付着する熱水抽出可能な多糖類がゾル化した状態を維持して、藻体からの炭化水素回収を試みた。

3.3.4 ゾルゲル転移を示す多糖類のゾル状態が藻体の炭化水素回収に及ぼす影響

70℃および80℃で熱水抽出される多糖類はゾルゲル転移を示すことから、常温では多糖類がゲル状態で存在する。多糖類がゲル状態にある時は、藻体スラリーからの炭化水素回収率は非常に低い。理由として、常温でゲル化し、藻体の周りに付着した多糖類が、藻体が保持する炭化水素と有機溶媒の接触を妨げることが考えられる。そこで、熱水抽出される多糖類をゾル化させた状態で炭化水素の回収を試みるために、加熱処理温度を保持した状態で炭化水素回収を行った。常温抽出と加熱処理温度抽出による藻体スラリーからの炭化水素回収率を図 3-16 に示す。グラフは3回繰り返し行った実験結果の平均値である。常温抽出ではこれまでに述べた実験と同様に90℃の加熱処理でのみ、炭化水素を高い効率で回収できた。一方、加熱処理温度抽出では、70℃および80℃でも90%以上の炭化水素を回収できた。しかし60℃では回収できなかった。

以上の結果から、タンパク質変性後の70℃および80℃で藻体から溶出する多糖類が可逆的にゾルゲル転移し、ゾル状態では炭化水素回収を可能にするが、ゲル状態では炭化水素回収を妨げることが示された。90℃で熱水抽出された多糖類は、ゾルゲル転移を示さなかったことから、不可逆的にゾル状態になったと考えられる。炭化水素が回収できたのは、加熱処理により *B. braunii* のコロニー表面を覆う Colony Sheath が溶出し、コロニー表面から消失したことにより、コロニー表面に存在している炭化水素と有機溶媒が接触できたことによると示唆される。しかし、3.3.3において80℃と90℃で熱水抽出される多糖類の構成成分はほぼ同等であることを確認した一方で、80℃と90℃で熱水抽出される多糖類の状態に相違がある理由は不明である。そこで、次項では、90℃以上の加熱前処理を施すことにより常温においても藻体からの炭化水素回収が可能になる理由を明らかにするために、80℃と90℃で熱水抽出された多糖類の分子量を測定した。

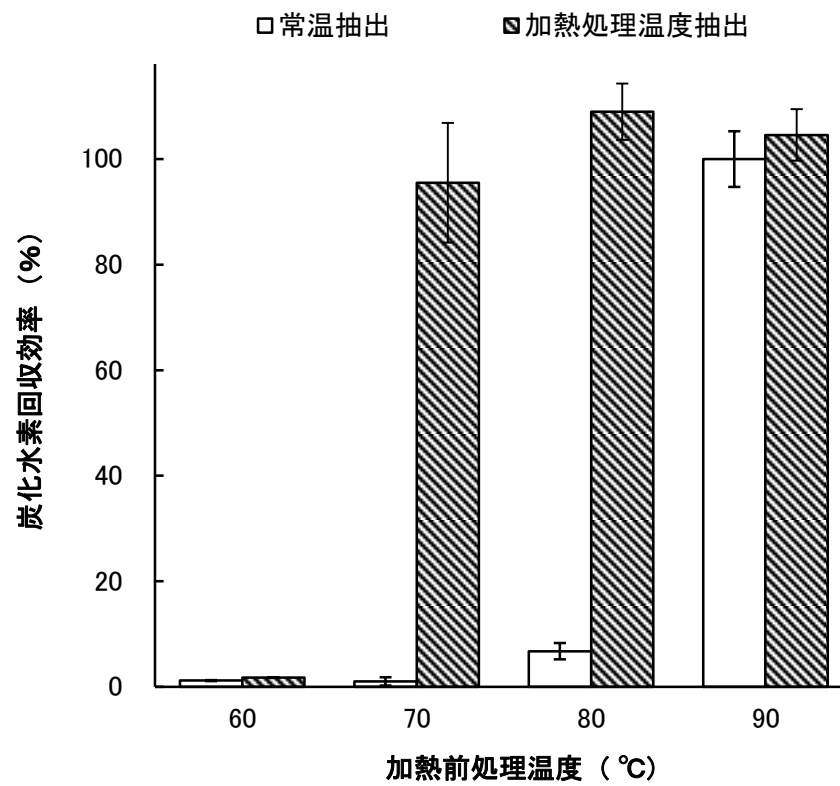


図 3-16 常温抽出と加熱処理温度抽出による *B. braunii* からの炭化水素回収率

3.3.5 異なる温度で熱水抽出される多糖類の分子量

表 3-2 および図 3-17 に熱水抽出される多糖類の高温 GPC による分子量測定の結果を示す。記載した数値は 3 回の実験の平均値と標準偏差である。Mw の結果から、90℃で熱水抽出された多糖類の分子量 ($M_w: 2.14 \pm 0.04 \times 10^6$) は、70℃ ($M_w: 2.55 \pm 0.07 \times 10^6$) および 80℃ ($M_w: 2.46 \pm 0.16 \times 10^6$) で熱水抽出した多糖類の分子量と比べて、分子量が低下している傾向にあった。また、Mw/Mn は分子量分布の幅を表す数値で、この値が 1 に近いほど、分子量の分布幅が狭いことを示す。70℃の Mw/Mn は 1.99 ± 0.08 、80℃の Mw/Mn は 2.19 ± 0.19 、および 90℃の Mw/Mn は 2.37 ± 0.05 であったことから、熱水抽出温度を上げていくと、分子量分布が広くなることが明らかになった。表 3-1、図 3-12 に示したように、80℃と 90℃で熱水抽出された多糖類の化学組成にほとんど差がないが、DSC による熱分析の結果より、80℃で抽出した多糖類はゾルゲル転移を示すのに対し、90℃で抽出した多糖類はゾルゲル転移を示さない。これらの結果から、藻体スラリーを 90℃以上で加熱すると、多糖類は分子量が低下しゾルゲル転移能を失って、不可逆的なゾル状態になると考えられる。その結果、常温でも多糖類がゲル化せず、藻体コロニーから除去されやすくなり、炭化水素回収が可能になることが示唆された。

表 3-2 熱水抽出される多糖類の分子量(Mw)

熱水抽出 温度 (℃)	Mw ($\times 10^6$)	Mw/Mn
70	2.55	1.99
80	2.46	2.19
90	2.14	2.37

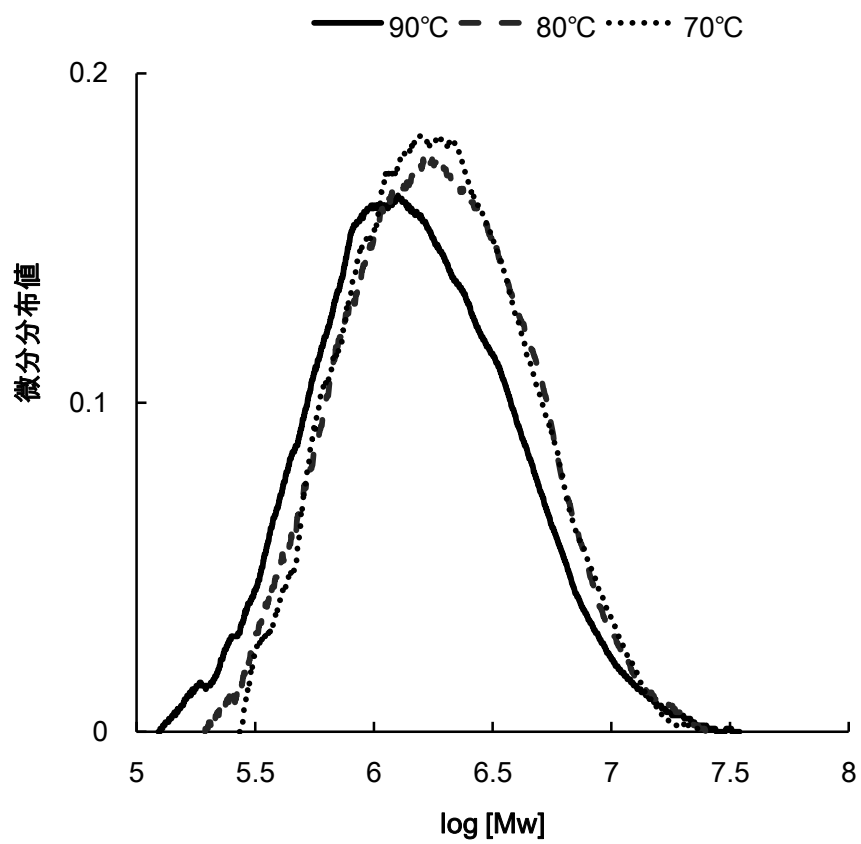


図 3-17 各温度で熱水抽出された多糖類の分子量分布

3.4 まとめ

本章は、*B. braunii*を構成するタンパク質と藻体から熱水抽出される多糖類の熱物性変化に着目し、「加熱処理による藻体からの炭化水素回収」のメカニズムを説明することを目的とした。

本章で得られた結果をもとに、図 3-18 に、*B. braunii* Showa 株のタンパク質および熱水抽出多糖類の加熱による状態変化と、常温抽出及び加熱処理温度抽出による炭化水素回収率の関係を示す。まず、DSC による熱分析から、藻体を構成するタンパク質は約 64℃で変性した。次に、タンパク質の変性温度より高温で、熱水抽出される多糖類の溶出量が増大した。この多糖類は、ガラクトース、アラビノースを主とする中性糖およびカルボキシル基を持つウロン酸を主とする酸性糖で構成されていた。

藻体から異なる温度で熱水抽出される多糖類の熱分析を行ったところ、タンパク質の変性温度（64℃）より高い 70℃、80℃で熱水抽出される多糖類は、ゾルゲル転移を示した。これらの多糖類は、常温に戻る過程でゲル化して藻体の周りに再付着し、炭化水素の回収を阻害する可能性が高いことが示唆された。そこで、加熱処理温度を維持して多糖類をゾル化させた状態で炭化水素を回収したところ、70℃および 80℃でも炭化水素を回収できた。一方で、90℃で熱水抽出される多糖類は、ゲル化能をもたず、藻体の周りに再付着しないため、常温でも炭化水素を回収できることが示唆された。90℃で熱水抽出される多糖類の分子量は、70℃、80℃で熱水抽出される多糖類と比較して分子量が低下していた。分子量低下により、熱水抽出される多糖類のゲル化能が喪失したと考えられる。

以上の結果から、常温で *B. braunii*から炭化水素を回収するためには、ゲル化能が失われる 90℃以上の加熱処理が必要であることが明らかになった。特に、タンパク質の変性後、70℃以上で *B. braunii*から溶出するガラクトース、アラビノースおよびウロン酸で構成される多糖類が、ゾルゲル転移に関与し、ヘキサンなどの有機溶媒による炭化水素回収を阻害している可能性がある。培養時にこれらの熱水抽出多糖類の生成を抑制することで、加熱処理工程の省略による炭化水素回収が期待できる。そこで、次章では、培養時に藻体から熱水抽出される多糖類の構成成分を変化させ、炭化水素回収を試みる。

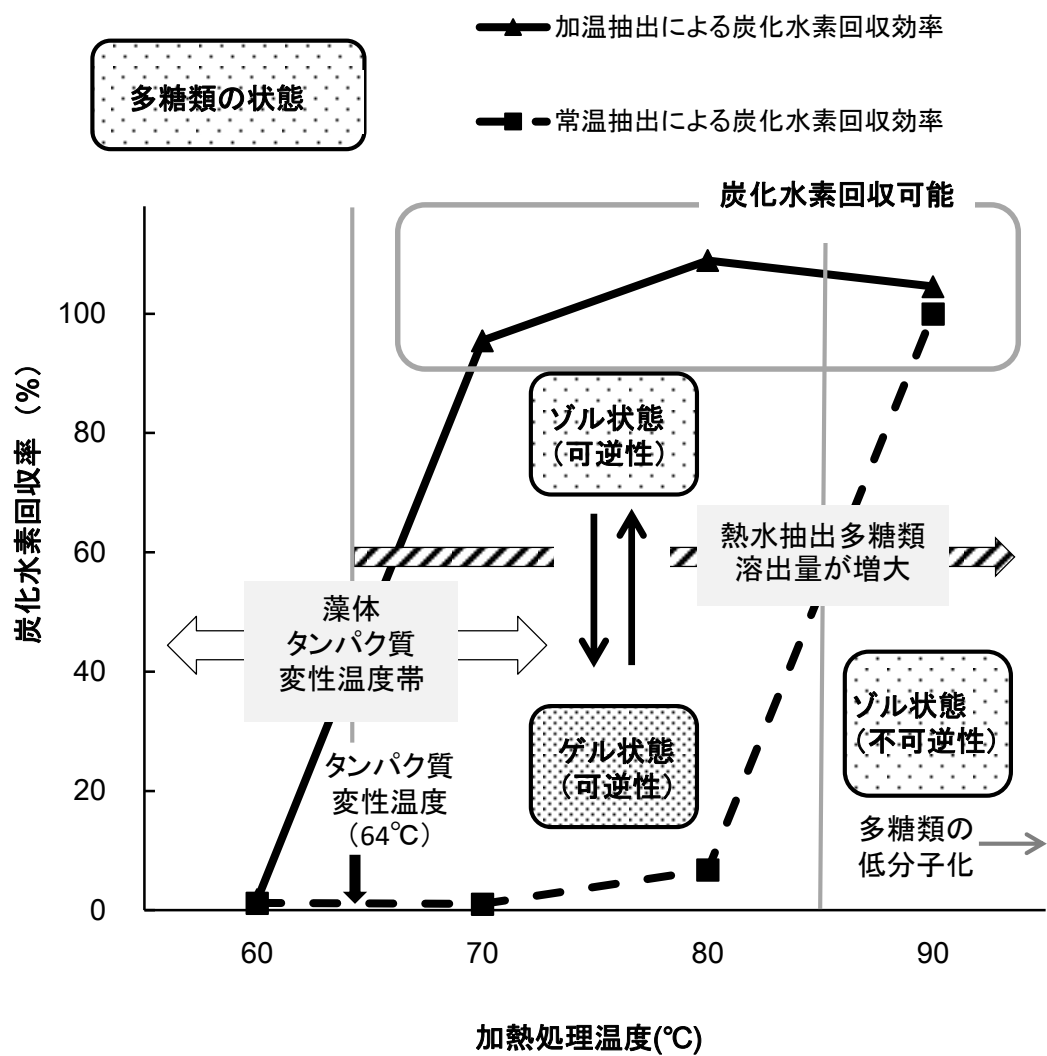


図 3-18 *B. braunii* Showa 株の加熱処理によるタンパク質および多糖類の状態変化と炭化水素回収率の関係

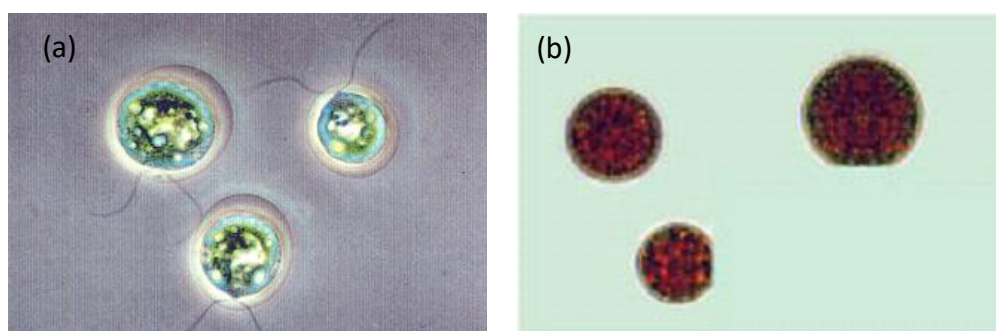
第4章 特殊光源を用いた培養による *B. braunii* の多糖類の構成変化が炭化水素回収に及ぼす影響

4.1 背景および目的

4.1.1 炭化水素を蓄積する細胞外マトリクス (ECM) に関する既往の研究

B. braunii は、生産される炭化水素の大部分を、ECM に蓄積する [1, 2]。一方で、熱水抽出される多糖類もまた ECM 中に存在し、有機溶媒で炭化水素の回収を試みても ECM 中の多糖類が選択的にヘキサンと相互作用することで、有機溶媒による炭化水素の回収を阻害することが考えられる。しかし、ECM に存在する多糖類に関する研究はほとんどない。

B. braunii の ECM に関する既往の研究から、ECM は、アルジナンや細胞外カロテノイドなどの炭化水素関連化合物や粘質多糖類等が複雑に重合したバイオポリマーにより形成されたと考えられてきた [3]。細胞外カロテノイドは、B 品種の ECM 中にも光合成には用いられない二次カロテノイドとして存在が認められている [4]。Okada らは、これら細胞外カロテノイドとして botryoxanthin や braunixanthin を単離し、それらの構造決定を行った [5, 6]。細胞外カロテノイドは、echinenone 等のケトカロテノイドと、遊離炭化水素としてはマイナー成分であるメチルスクアレン類が、アセタールあるいはエーテル結合を介して結合しており、重合化により ECM の形成に関与している可能性が高い。*B. braunii* におけるこれらの細胞外カロテノイドの生物学的機能はいまのところ不明である。しかし、*Dunaliella* や *Haematococcus* 等、他の微細緑藻が蓄積するカロテノイドの機能として、紫外線からの防御機能があげられる [7]。*Haematococcus* は淡水性単細胞緑藻で、普段は緑色をしているが、紫外線などの環境ストレスにより藻体内に astaxanthin が作られ、赤く変色し細胞を保護している (図 4-1) [8]。このような藻類の機能性からも、本藻種の二次カロテノイドの生産量は、短波長の光 (紫外線) により増減し、細胞を保護する可能性がある。



(a) 単細胞緑藻
Haematococcus pluvialis

(b) 細胞内にastaxanthinを蓄えた
Haematococcus pluvialis

図 4-1 紫外線などの環境ストレスで細胞内にアスタキサンチンを生産する淡水性単細胞緑藻

Haematococcus Pluvialis

東洋酵素化学株式会社より提供

2 章では、*B.braunii* から熱水抽出される多糖類が有機溶媒と相互作用を示し両親媒性を示すことを明らかにした。熱水抽出可能な多糖類が藻体コロニーに残留することで抽出溶媒と選択的に相互作用を示し、炭化水素回収を阻害することが考えられる。藻体から炭化水素を溶媒回収するためには、熱水抽出される多糖類を藻体から除去する必要があることを示した。また、3 章では、熱水抽出される多糖類がゲル状態にあるとき、藻体からの炭化水素回収を妨げることを明らかにした。ゲル化した多糖類が藻体の周りに付着し、ヘキサンなどの有機溶媒と藻体中の炭化水素との接触を妨げるが示唆された。このゲル化した多糖類をゾル化すると炭化水素を回収できることを明らかにした。さらに、熱水抽出される多糖類は、ガラクトース、アラビノースを主とする中性糖およびウロン酸を主とする酸性糖で構成されることを明らかにした。以上の研究成果から、*B.braunii* から熱水抽出可能な多糖類の構成成分であるガラクトース、アラビノースおよびウロン酸の割合が下がれば、*B. braunii* からの炭化水素の回収率が上がる可能性が考えられる。

4.1.2 本章の目的

既往の研究から、*B. braunii* の ECM には、紫外域の光による光阻害の防御機能としてカロテノイド等の構成成分を変化させる仕組みが備わっていると仮定できる。そこで本章では、短波長側の紫色光を除去した照射光で *B. braunii* を培養し、炭化水素および多糖類の生成量を変化させる試みを行った。光源にはピーク波長の異なる 6 種類の LED を用いた。まず、カロテノイドの生成に寄与すると考えられる紫色光を除いて藻体を培養し、炭化水素の回収率を調べた。次に炭化水素の回収率の高い藻体と低い藻体の熱水抽出多糖類の構成成分を比較することで、炭化水素回収性の高い藻体における熱水抽出多糖類の構成成分を明らかにすることを目的とした。

4.2 研究の方法

4.2.1 特殊光源を用いた培養

2 章、3 章と同様、*B. braunii* の B 品種 Showa 株を試料とした。改変 Chu13 培地用いて 1200 mL 用ガラス製扁平型培養瓶で培養した。室温 25℃、明期暗期 12 時間周期とし、二酸化炭素濃度 1.0vol-%を付加した空気を供給した [9]。培養開始から 21 日（3 週間）経過した培養液を収穫した。収穫には孔径 20 μ m のナイロンメッシュシートを使用し、培養液を吸引濾過した。

光源には、ピーク波長の異なる 6 種類の LED を有する 6 波長帯光混合照射用 LED 光源（以下、LED 光源）を用いた。各ピーク波長は 405 nm（紫色）、465 nm（青色）、530 nm（緑色）、595 nm（オレンジ色）、660 nm（赤色）、および 735 nm（遠赤色）である。各波長の出力は、それぞれ調整できる。LED の配列は、LED が 25（5×5）個の基本モジュールからなり、1 つの光源ユニットは 16（4×4）のモジュールから成る。図 4-2 に基本モジュールの LED 配列を示す。また図 4-3 に光源ユニット点灯時の写真を、図 4-4 に培養の様子を示す。

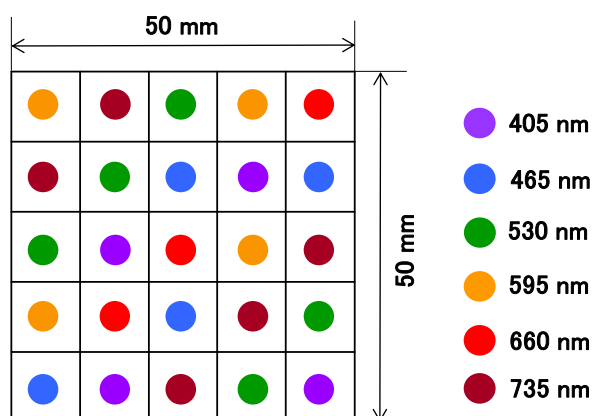


図 4-2 基本モジュールの LED 配置

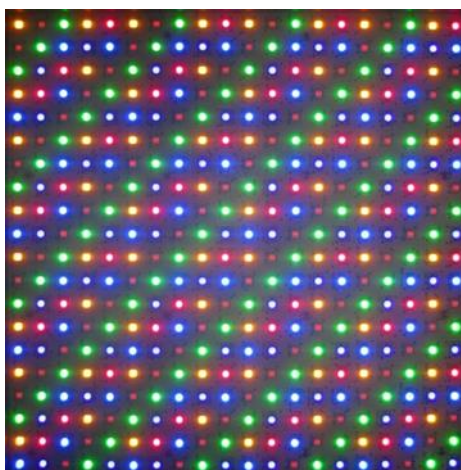


図 4-3 6 波長混合照射用 LED

外径 200 mm × 200 mm で 16(4 × 4) の基本モジュールで構成.

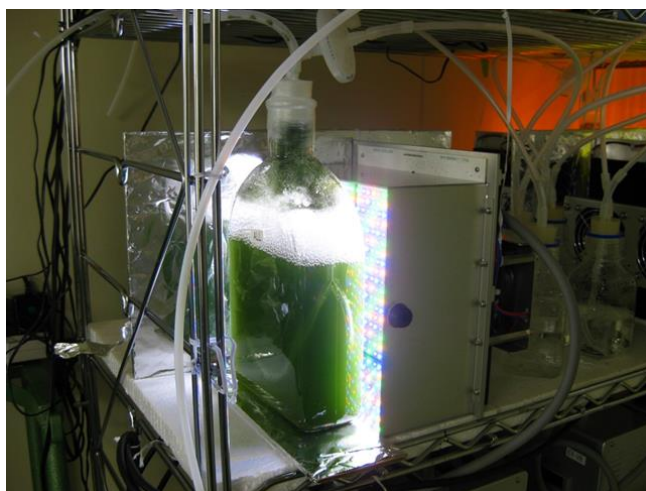


図 4-4 6 波長混合照射用 LED を用いた培養の様子

試験区は、紫色 LED のみを消灯した Ex-V 区と、紫色 LED から遠赤色 LED まで 6 種類の波長すべてを点灯した ALL 区とした。照射光のガラス製扁平型培養瓶の表面における光合成有効光量子束密度 (PPFD) の総量は、両方試験区で同じ $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とした。すなわち ALL 区では、各 LED からの照射光の PPFD を、それぞれ $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と

し、Ex-V 区では、紫色 LED からの照射光の分を青色 LED、緑色 LED、オレンジ色 LED、および赤色 LED からの照射光に等量ずつ按分し、それぞれ $37.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とした（表 4-1）。

また本実験では、太陽光に含まれており、植物の光応答において重要な役割を担う遠赤色光を照射光に組み入れた。遠赤色光は、光合成に有効とされる波長範囲外の光である。両試験区で、735nm 遠赤色 LED の照射光の光量子束密度（PFD）を $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に設定した（表 4-1）。

各試験区のガラス製扁平型培養瓶の表面における、培養開始時および終了時の PPFD（405-660 nm LED）と PFD（735 nm）を図 4-5 に示す。PPFD および PFD は、培養開始時と終了時の間の差は小さく、各試験区が安定的な光条件のもとで培養が行われたことを確認した。

表 4-1 ピーク波長 405～660 nm LED 照射光の PPFD^{*} と 735 nm LED 照射光の PFD^{}**

ピーク波長(nm)	405	465	530	595	660	Total	735
All	30	30	30	30	30	150	30
Ex-V	0	37.5	37.5	37.5	37.5	150	30

* PPFD は波長帯 400-700 nm の光量子束密度($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$),

* * PFD は光量子束密度($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

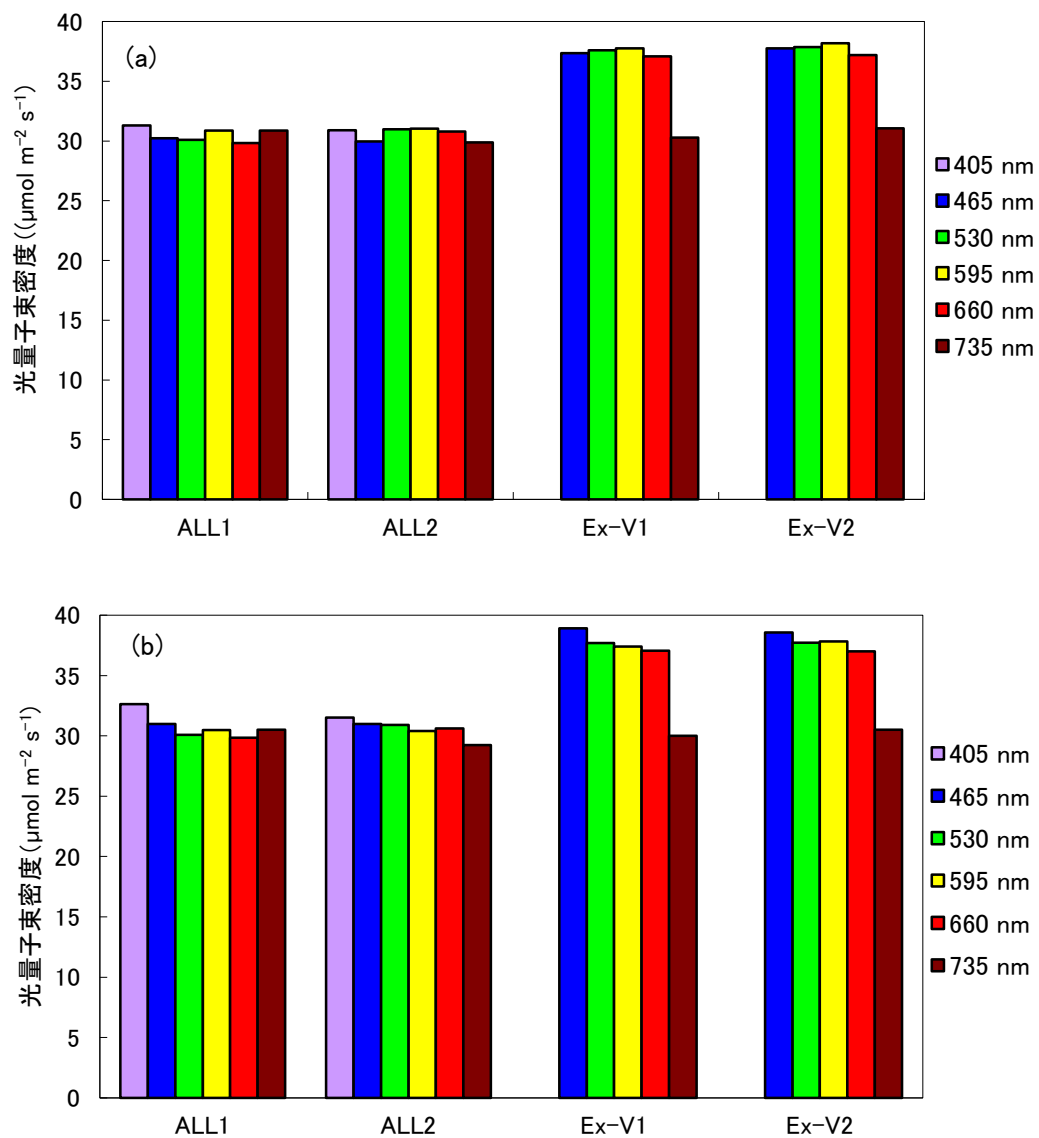


図 4-5 培養実験前後における各ピーク波長の光子束密度の変化

(a)は培養開始時、(b)は培養終了時を示す。

4.2.2 培養時における紫色光の有無が *B. braunii* の炭化水素回収性に及ぼす影響

両試験区の藻体生産量は、21 日間培養後の *B. braunii* の培養液を 10mL 採り、秤量した 47 mmφ のワットマングラスフィルター (Whatman, GE ヘルスケア・ジャパン株式会社) により吸引濾過した。このガラスフィルターを水分計で乾熱乾燥後、藻体の乾燥重量により測定した。

B. braunii からの炭化水素の回収は次のように行った。まず濃度を 1.5 g L^{-1} に調整した藻体スラリーを 100 mL ずつガラス瓶に分注し、オートクレーブ (SX-700, Seiko 株式会社 トミー精工) を用い所定温度 (70~90℃) で 10 分間加熱した。これを分液ロートに入れ、同量のヘキサンを加えて攪拌し、上層のヘキサン相をナス型フラスコへ分離する溶媒抽出操作を 2 回繰り返した。その後、ロータリーエバポレーターにより減圧蒸留しヘキサンを除去した。減圧蒸留により得られた抽出物を炭化水素画分とした。得られた炭化水素画分は色素などの夾雑物を含む。そこでこれら夾雑物を除き炭化水素を精製するために、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (C-300, 和光純薬工業株式会社) に付し、展開溶媒としてヘキサンを用いて炭化水素を溶出した。シリカゲルカラムを通過したヘキサン相をロータリーエバポレーター (Rotavapor R-215, 日本ビュッヒ株式会社) にて減圧蒸留し、ヘキサンを除去した。ヘキサンを完全に除去した後の抽出物を加熱処理法による炭化水素回収量として重量を測定した。

加熱処理による炭化水素回収率は、乾燥藻体中に含まれる炭化水素量を 100% として、加熱試料からヘキサン抽出操作により回収された炭化水素の割合であるため、乾燥藻体中に含まれる炭化水素の量を測定する必要がある。乾燥藻体中に含まれる炭化水素量は次の方法により測定した。乾燥重量ベースで 0.15 g の藻体スラリーを凍結乾燥した。この凍結乾燥物にヘキサンを加えて静置後、黄色に着色したヘキサン相をナス型フラスコに分離し、この操作をヘキサン相が無色透明になるまで繰り返した。分離後のヘキサン相をロータリーエバポレーター (Rotavapor R-215, 日本ビュッヒ株式会社) により減圧蒸留し、ヘキサンを除去した。以下、加熱処理による炭化水素の回収と同じ手順で炭化水素を精製し、得られた炭化水素の重量から、乾燥藻体の炭化水素含有率を求めた。加熱処理による炭化水素回収量を乾燥藻体の炭化水素含有量で除し、ALL 区および Ex-V 区で培養した場合の炭

化水素回収率を確認した。紫色光の有無で培養した *B. braunii* の藻体生産量と、各加熱処理における炭化水素回収率の実験フローを図 4-6 中の太字に示す。

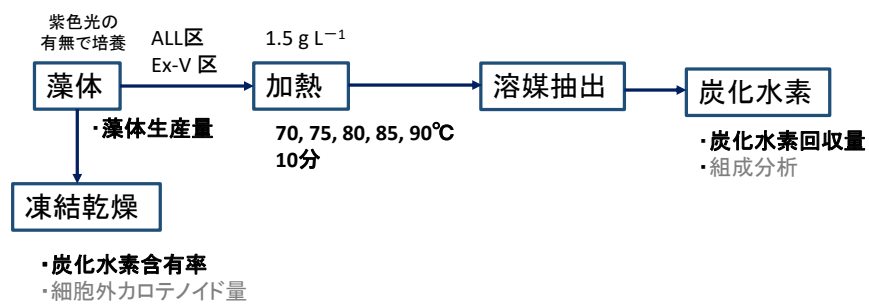


図 4-6 ALL 区(紫色光有)および Ex-V 区(紫色光無)で培養した *B. braunii* の藻体生産量および異なる加熱処理温度による炭化水素回収率の実験フロー

4.2.3 培養時における紫色光の有無が *B. braunii* の炭化水素組成に及ぼす影響

培養時における紫色光の有無が炭化水素の組成に及ぼす影響を調べるために、ALL 区および Ex-V 区で培養した藻体を 90℃ で加熱処理して回収した炭化水素について、キャピラリーカラム (Rtx-1 ; 30 m) を用いて GC (GC-2014, 株式会社島津製作所) による組成分析を行った。カラム温度は、初期温度 50℃ 1 分間保持し 50℃ から 220℃ まで 10℃ min⁻¹ で昇温させ 3 分間保持したあと、さらに 2℃ min⁻¹ で 260℃ まで昇温させ 3 分間保持した。検出器 (FID) の温度を 280℃ とした。キャリアーガスはヘリウムを使用した。

次に GC 分析で得た主要ピーク成分について構成炭化水素を同定するために、キャピラリーカラム (InertCap 1MS ; 60 m) を用いて GC-MS (GCMS-QP2010 Ultra, 株式会社島津製作所) によりマススペクトルを検出した。測定条件は GC 分析と同じであった。4 章の実験フローのうち、ALL 区および Ex-V 区で培養した *B. braunii* を 90℃ で加熱処理し得られた炭化水素の組成分析を図 4-7 中の太字に示す。

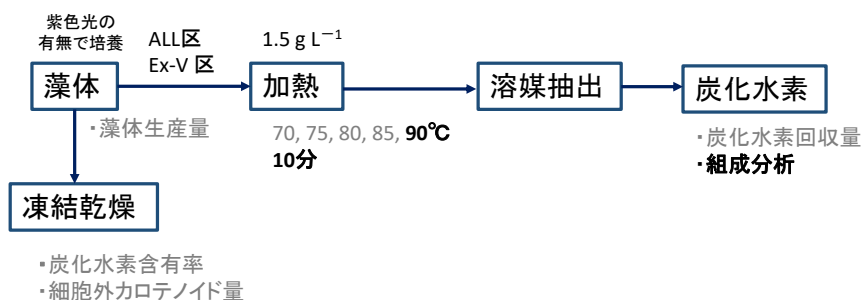


図 4-7 ALL 区(紫色光有)および Ex-V 区(紫色光無)で培養した *B. braunii* の炭化水素の組成分析の実験フロー

4.2.4 培養時における紫色光の有無が *B. braunii* の細胞外カロテノイド量に及ぼす影響

ALL 区およびで培養した *B. braunii* の細胞外カロテノイドの定量は、次の手順により行った。まず、2 つの試験区で培養した藻体の凍結乾燥物 0.2 g を定量し、これにヘキサンを加えて静置後、黄色に着色したヘキサン相をナス型フラスコに分離した。この操作をヘキサン相が無色透明になるまで繰り返した。次に、分離後のヘキサン相をロータリーエバポレーター (Rotavapor R-215, 日本ビュッヒ株式会社) により減圧蒸留し、ヘキサンを除去することで細胞外カロテノイドを分離した。得られた細胞外カロテノイドに再びヘキサンを 50 mL 加え、これを細胞外カロテノイド抽出物とした。カロテノイドの定量は、紫外可視近赤外分光光度計 (UV-1800, 株式会社島津製作所) を用い、McBeth の手法に従い波長 450 nm の吸光度を測定した。得られた吸光度から、カロテノイドの吸光係数を用いて総カロテノイド量を算出し、細胞外カロテノイド量とした [10]。4 章における実験フローのうち、ALL 区および Ex-V 区で培養した *B. braunii* の細胞外カロテノイドの測定を図 4-8 中の太字に示す。

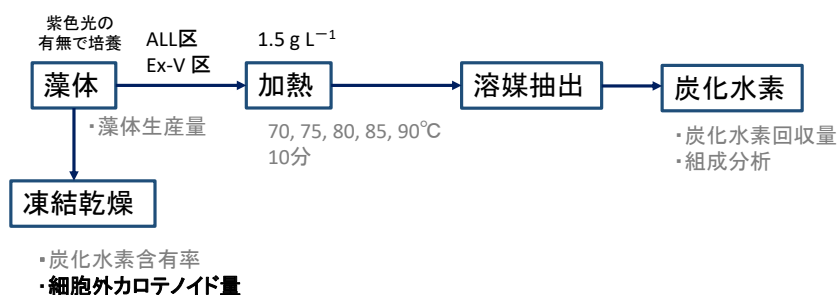


図 4-8 ALL 区(紫色光有)および Ex-V 区(紫色光無)で培養した *B. braunii* の細胞外カロテノイドの実験フロー

4.2.5 培養時における紫色光の有無が *B. braunii* から熱水抽出される多糖類量および組成に及ぼす影響

各試験区で培養された *B. braunii* の ECM から熱水抽出される多糖類の定量を下記の通り行った。50g L⁻¹に調整した藻体スラリーを 10mL ずつ遠心チューブに分注し、加熱処理を行った。加熱処理は、オートクレーブ(SX-700, Seiko 株式会社トミー精工)を用い 85℃ で 10 分間加熱した。加熱処理後の藻体スラリーを遠心分離(LC-200, 3650 ×g, 10 min, 株式会社トミー精工)し、多糖類を含む液相を分離した。さらに、分離した液相をフィルターでろ過し、夾雑物を取り除いた溶液を最終的に「*B. braunii* の ECM 中の多糖類溶液」とした。ALL 区および Ex-V 区で培養した *B. braunii* の多糖類の溶出量は、この多糖類溶液を凍結乾燥し、重量測定を行うことにより算出した。

次に多糖類の組成分析を次の手順で行った。中性糖の定量は、NREL 技術報告書 [11]に記載された方法をもとに行った。加水分解液中のグルコース、ガラクトース、アラビノースの分析は、糖分析用カラム (SUGAR SP0810; 商標登録 Shodex, 昭和電気株式会社)、示差屈折率検出器 (RID-10A, 株式会社島津製作所) を搭載した高速液体クロマトグラフ (HPLC; LC-20, 株式会社島津製作所) を用いた。ウロン糖 (酸性糖) の定量は、カルバゾール硫酸法により行った。試料を調製後、分光光度計 (U-2001, 株式会社日立製作所) により波長 530 nm の吸光度を測定した。グルクロン酸濃度に換算し、ウロン酸相当量とした。窒素の定量は、全自動元素分析装置 (2400 II, PerkinElmer Co., Ltd.) により行った。灰分の測定については、CHN コーダー (MT-6, 株式会社ヤナコ機器開発研究所) を用いて行った。4 章の実験フローのうち、ALL 区および Ex-V 区で培養した *B. braunii* から熱水抽出される多糖類の組成と溶出量の測定を図 4-9 中の太字に示す。

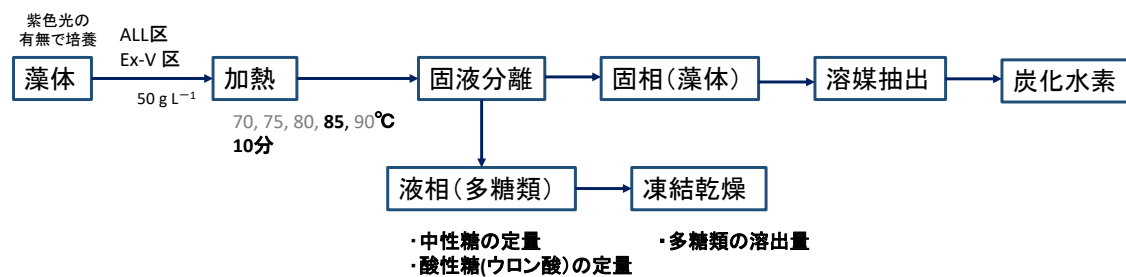


図 4-9 ALL 区(紫色光有)および Ex-V 区(紫色光無)で培養した *B. braunii* から熱水抽出される多糖類の組成分析の実験フロー

4.3 結果および考察

4.3.1 培養時における紫色光の有無が *B. braunii* からの炭化水素回収率に及ぼす影響

図 4-10 に各加熱処理温度における炭化水素回収率を示す。グラフは 3 回繰り返し行った実験結果の平均値と標準偏差である。Ex-V 区で培養した藻体は、低い温度から炭化水素が回収されることが明らかになった。まず、すべての照射光を照射した ALL 区では、70℃から徐々に抽出され始め、90℃において 90%以上の炭化水素が回収された。一方で、紫色光を消灯してそれ以外の 5 種類の LED を照射した Ex-V 区は、同じように 70℃付近から炭化水素が回収され始めるが、各温度において回収率が高くなり、85℃でその回収率が 90%以上に達した。Ex-V 区の方が ALL 区に比べて、85℃以下の低い温度において、それぞれの炭化水素回収率が向上した。この結果から、紫色光を含まない光で培養すると加熱処理による炭化水素の回収率が向上することが明らかとなった。ここで炭化水素の回収率が向上しても、藻体自身の生産量や炭化水素生産量が減少しては意味がない。そこで次の項では、藻体の生産量と炭化水素含有量の比較を行うことにした。

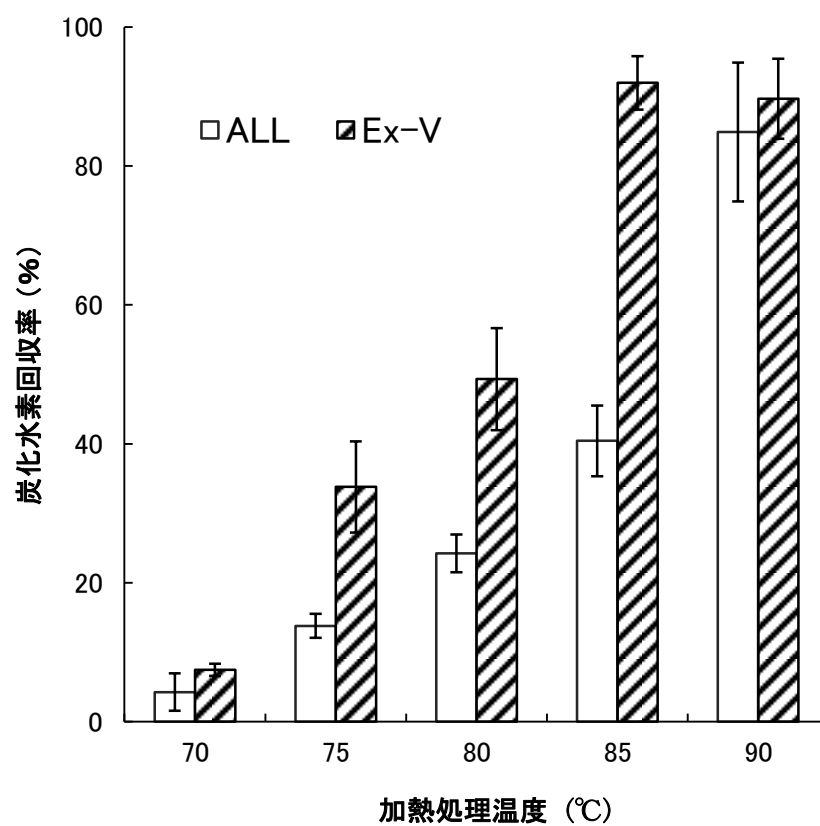


図 4-10 ALL 区(紫色光有)および Ex-V 区(紫色光無)で培養した *B. braunii* からの加熱処理法を用いた炭化水素回収率 (±SD; n=3.)

4.3.2 培養時における紫色光の有無が *B. braunii* の生産量および炭化水素生産量に及ぼす影響

図 4-11 (a) は ALL 区および Ex-V 区における藻体生産量を示す。培養開始時の藻体量は、共に $0.4 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1}$ であった。この数値は 3 回の測定値の平均と標準偏差を示す。21 日培養後、各試験区の藻体生産量は、ALL 区が $2.2 \pm 0.04 \text{ g L}^{-1}$ 、Ex-V 区が $2.3 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1}$ であった。この数値は ALL 区および Ex-V 区のそれぞれの培養瓶 2 本から 1 本あたり 3 回測定した計 6 回の測定値の平均と標準誤差を示す。藻体生産量は、Welch の T 検定による統計的有意差分析において、2 つの試験区において有意差は示されなかった ($p > 0.05$)。

次に藻体が生産する炭化水素量を評価した。図 4-11(b) は各試験区で培養された乾燥藻体の炭化水素含有率を示す。測定は 3 回行った。乾燥藻体中の炭化水素の含有率は、Ex-V 区が $38.7 \pm 0.8\%$ 、ALL 区が $36.0 \pm 0.1\%$ であり、Welch の T 検定による統計的有意差分析において有意差が示され ($p < 0.05$)、Ex-V 区の方が 3% 近く向上することが確認された。

以上の結果から、紫色光を含まない光で培養しても、藻体生産性が変わらず炭化水素含有率が若干向上することから、Ex-V 区で培養した *B. braunii* は、問題なく生育していることを確認した。

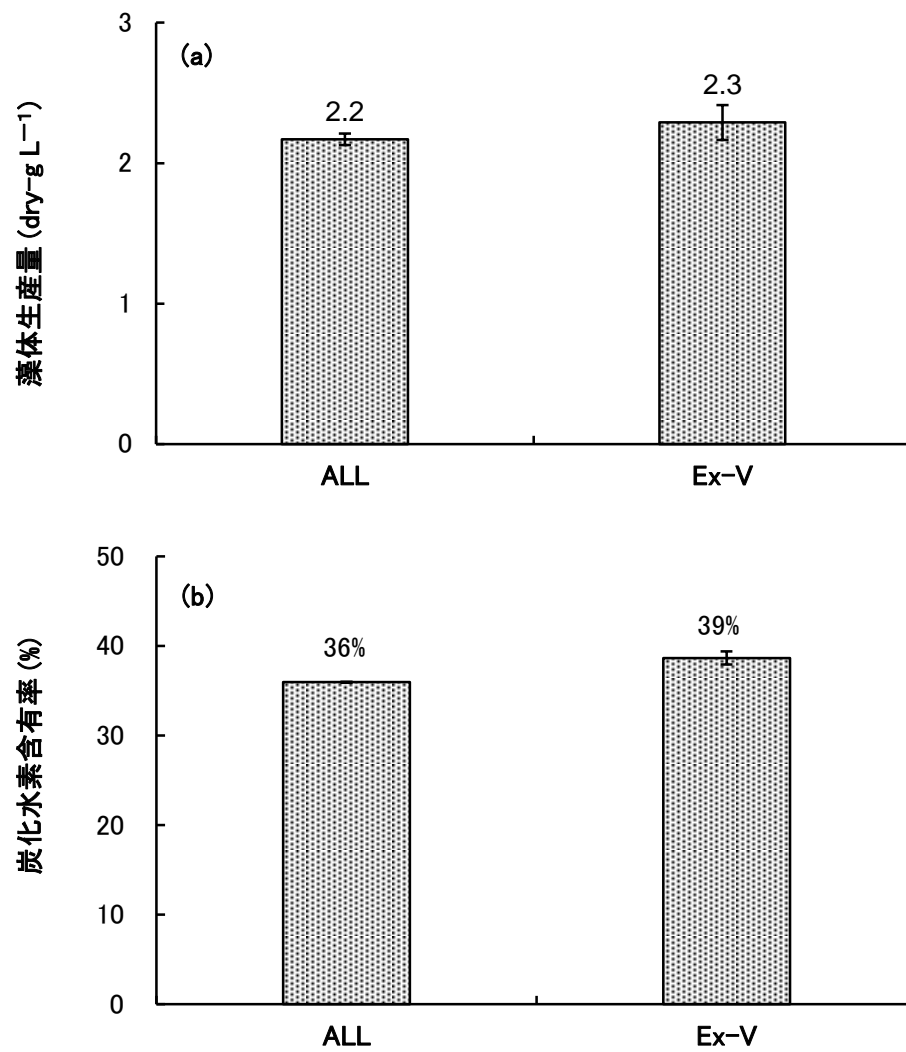


図 4-11 ALL 区(紫色光有)および Ex-V 区(紫色光無)で培養した *B. braunii* の藻体生産量と炭化水素含有量の比較 (±SD; n=3.)

4.3.3 培養時における紫色光の有無が *B. braunii* の炭化水素組成に及ぼす影響

ALL 区および Ex-V 区で培養した *B. braunii* の炭化水素組成の確認を行った。2つの試験区で培養された *B. braunii* から回収された炭化水素のクロマトグラムを図 4-12 に示す。2つの試験区において、ともに保持時間 33 min から 36 min の間に複数のピークが得られ、その保持時間は2つの試験区で一致した。図 4-12 a は 6 種類全ての LED を含む光源、ALL 区（紫色光有）で培養された藻体から生産された炭化水素、b は紫色光を含まない光源、Ex-V 区（紫色光無し）で培養された藻体から生産された炭化水素のクロマトグラムを示す。GC により得られた各ピークは非常に近接しており、紫色光を含まない光源で培養された藻体の炭化水素の成分は、紫色光を含む光源で培養された藻体の炭化水素とほぼ同じ構成であることが予測された。

そこで、GC-MS により得られたマススペクトルパターンから（2.3.4 参照）2つの試験区で抽出された炭化水素の炭素数の同定を行ったところ、主に C₃₀ から C₃₄ の 9 種類の botryococcene (a ~ d は同位体) で構成されていることが分かった。B 品種は、C_nH_{2n-10} (n=30 ~ 37) の分子式で示される分岐型不飽和トリテルペン系炭化水素を生産し、これは主成分である botryococcene 類とマイナー成分のメチルスクアレン類を含む [12, 13]。最も相対存在比の高かった C₃₄ botryococcene は、2つの試験区ともに炭化水素の 50% 以上を占めていた。ALL 区および Ex-V 区で培養した *B. braunii* の炭化水素の組成と相対存在比を表 4-2 に示す。炭化水素成分の存在比は、2つの試験区でほとんど変わらないことが示された [12]。

B. braunii の B 品種の炭化水素組成は、増殖速度と密接に関連している [14]。増殖速度が速いときには C₃₀ botryococcene の生産速度に対し、そのメチル化が追いつかないことから、炭素数の少ない botryococcene 類の割合が高くなる。逆に、増殖速度が遅いときはメチル化されている botryococcene の割合が高くなる。本実験結果における炭化水素組成は C₃₄ の botryococcene が主成分であったことから、比較的増殖速度が遅かったと考えられる。しかし2つの試験区で培養された *B. braunii* の炭化水素組成にほとんど差が見られないことから、短波長側の光(紫色光) は増殖速度に影響を与えないことが考えられた。このことは培養終了時の藻体の増殖量に両者間の差がなかったことから支持される。

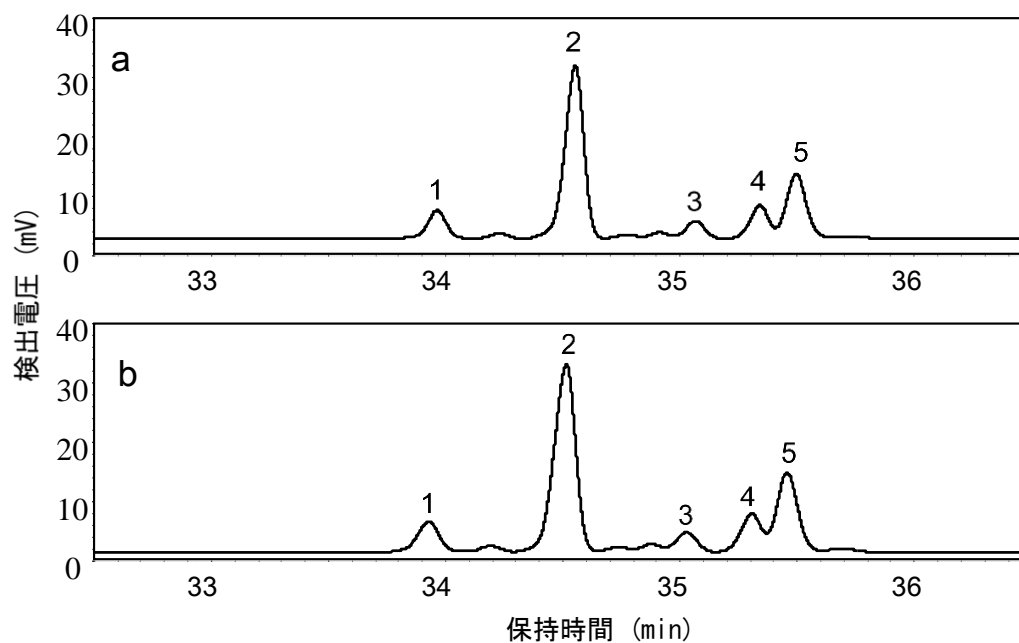


図 4-12 ALL 区(紫色光有)および Ex-V 区(紫色光無)で培養した *B. braunii* から生産される炭化水素のクロマトグラム

表 4-2 ALL 区(紫色光有)および Ex-V 区(紫色光無)で培養した *B. braunii* から生産される炭化水素の組成と相対存在比

ピーク番号*	炭化水素の組成**	相対保持時間	相対存在比(%)	
		(Squalene=1)	ALL	Ex-V
1	C ₃₀ botryococcene	0.872	0.1	0.1
	C _{34a} botryococcene	0.908	9.9	10.1
	C _{33a} botryococcene	0.915	1.9	2.0
2	C _{34b} botryococcene	0.926	50.2	50.7
	C _{34c} botryococcene	0.930	1.4	1.6
	C _{33b} botryococcene	0.933	1.4	1.4
3	C _{34d} botryococcene	0.938	5.0	5.2
4	C ₃₂ botryococcene	0.945	10.1	9.8
5	C _{33c} botryococcene	0.950	19.8	18.8

* 図 4-12 で示したクロマトグラム中のピーク番号、** a-d は異性体

4.3.1、4.3.2 の結果から、Ex-V 区で培養した *B. braunii* の加熱処理による炭化水素の回収性(図 4-10)および炭化水素の生産性(図 4-11)は向上することが明らかとなった。さらに 2つの試験区で培養した *B. braunii* の炭化水素の組成は同等である事が確認された(図 4-12、表 4-2)。炭化水素回収性の相違は、照射光の違いにより炭化水素が蓄積する ECM の構成成分に変化がもたらされた結果である可能性が示唆される。そこで以後の項では、2つの試験区における、ECM を構成する成分、特に紫色光の影響が大きいと思われるカロテノイドと本研究で着目する熱水抽出される多糖類について検討し、*B. braunii* からの炭化水素回収性を向上させる条件について考察を加える。

4.3.4 炭化水素回収性が向上した *B. braunii* における細胞外カロテノイドの生産量

既往の研究から、微細藻類においても短波長側の光を照射した際に、光阻害を防ぐための防御物質として ECM 中にカロテノイドが生成されることが知られている [7]。ALL 区および Ex-V 区で培養した *B. braunii* の細胞外カロテノイドの UV-VIS スペクトルは、紫外可視近赤外分光光度計 (UV-1800, 株式会社島津製作所) を用いて測定した。2 つの試験区のスペクトルは、一般的なカロテノイド同様、可視部に吸収があるとともに、紫外部にも吸収があることを示している。図 4-13 は ALL 区および Ex-V 区で培養した *B. braunii* の細胞外カロテノイドの生産量を示す。カロテノイド生産量は、Mcbeth の手法に従い波長 450 nm の吸光度により算出した。乾燥藻体当たりの細胞外カロテノイドの総量は、ALL 区が 263 mg \pm 16 mg、Ex-V 区が 184 mg \pm 35 mg であった。グラフは 3 回繰り返し行った実験結果の平均値である。よって、炭化水素の回収性が高かった Ex-V 区において、細胞外カロテノイドの生成が減少したことが明らかとなった。

以上の結果から、*B. braunii* の細胞外カロテノイドも光阻害から細胞を守るために生産されていることが示唆される。また、短波長側の紫色光をあてない培養により、細胞外カロテノイドの生産量が減少することで ECM の構造が弱くなり、結果的に ECM 中の炭化水素の回収が容易になることが考えられる。さらに、細胞外カロテノイド量の減少分が炭化水素生産に回され、炭化水素含有量の増加につながったことも示唆された。また、既往の研究において、色素を練り込んだフィルムを用い、短波長である紫外領域の光を光合成により有効な青色光に変換し、農園芸作物栽培に利用する技術も報告されている [15]。事業化の際、紫色光のような短波長を、光合成により有効な長波長側に変換することは、藻類と炭化水素の生産促進にとって有用であると考えられる。本実験では、細胞外カロテノイド総量を定量したが、上述の観点から、*B. braunii* のカロテノイド特性を知ることは重要であり、今後は B 品種の二次カロテノイドとして知られている botryoxanthin や braunixanthin [4, 5]等の定量も望まれる。

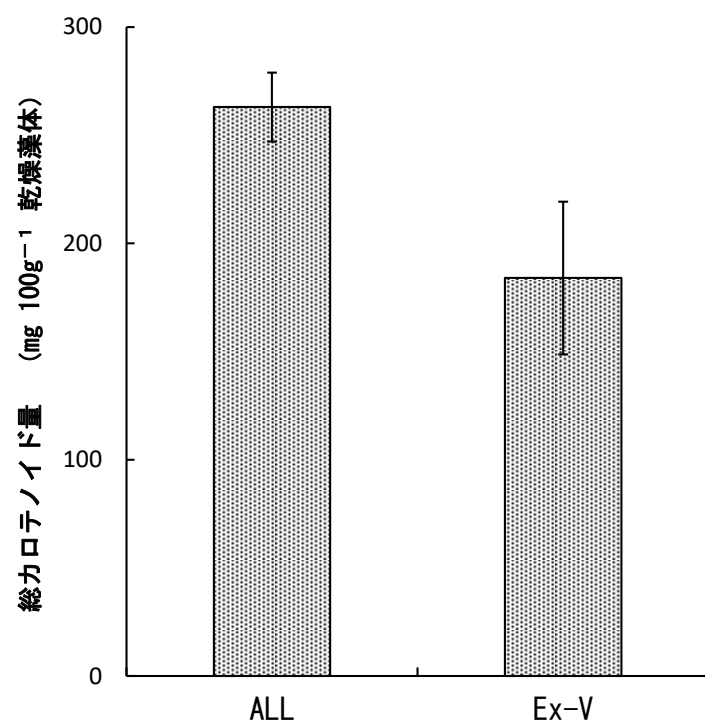


図 4-13 ALL 区(紫色光有)および Ex-V 区(紫色光無)で培養した *B. braunii* の細胞外カロテノイドの総カロテノイド量 (±SD; n=3.)

4.3.5 炭化水素回収性が向上した *B. braunii* における多糖類の溶出量および構成糖の変化

前項までに、短波長側の紫色光を含まない光源で *B. braunii* を培養すると、炭化水素の回収性が向上し、一方で ECM 中の細胞外カロテノイドの量が減少したことを述べた。次に、ALL 区および Ex-V 区で培養した *B. braunii* から熱水抽出される多糖類の溶出量と構成糖を検討した。

図 4-14 は、ALL 区および Ex-V 区で培養した *B. braunii* の 50 g L^{-1} 濃縮藻体スラリーを 85°C で熱水抽出した多糖類の溶出量を示す。グラフは 3 回繰り返し行った実験結果の平均値である。熱水抽出された多糖類の溶出量を乾燥藻体の重量 (g) 当たりに換算すると、Ex-V 区が $100.1 \pm 4.5 \text{ mg}$ 、All 区が $112.6 \pm 4.0 \text{ mg}$ であり、Ex-V 区の方が 10% 以上減少した。以上の結果から、*B. braunii* に含有する熱水抽出可能な多糖類の生産が抑えられると、*B. braunii* に含有する炭化水素の生産および回収が容易になることが示唆された。

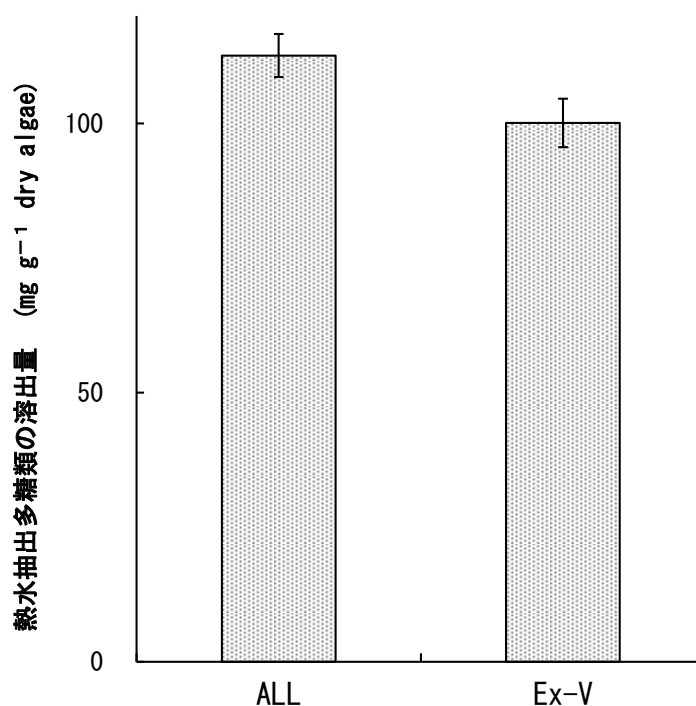


図 4-14 ALL 区(紫色光有)および Ex-V 区(紫色光無)で培養した *B. braunii* から熱水抽出された多糖類の生成量 (±SD; n=3.)

ALL 区および Ex-V 区で培養した *B. braunii* から熱水抽出された多糖類の組成を図 4-15 に示す。結果は同じ試験を 3 回行った平均である。*B. braunii* から熱水抽出される多糖類の組成は、Ex-V 区で培養した *B. braunii* において、ガラクトース、アラビノースを主とする中性糖とウロン酸を主とする酸性糖が減少した。

以上の結果から、ガラクトース、アラビノースを主とする中性糖とウロン酸を主とする酸性糖は、炭化水素の生産性や回収性に寄与していることが示され、これらで構成される多糖類は、*B. braunii* からの炭化水素の溶媒回収を阻害していることが示唆された。

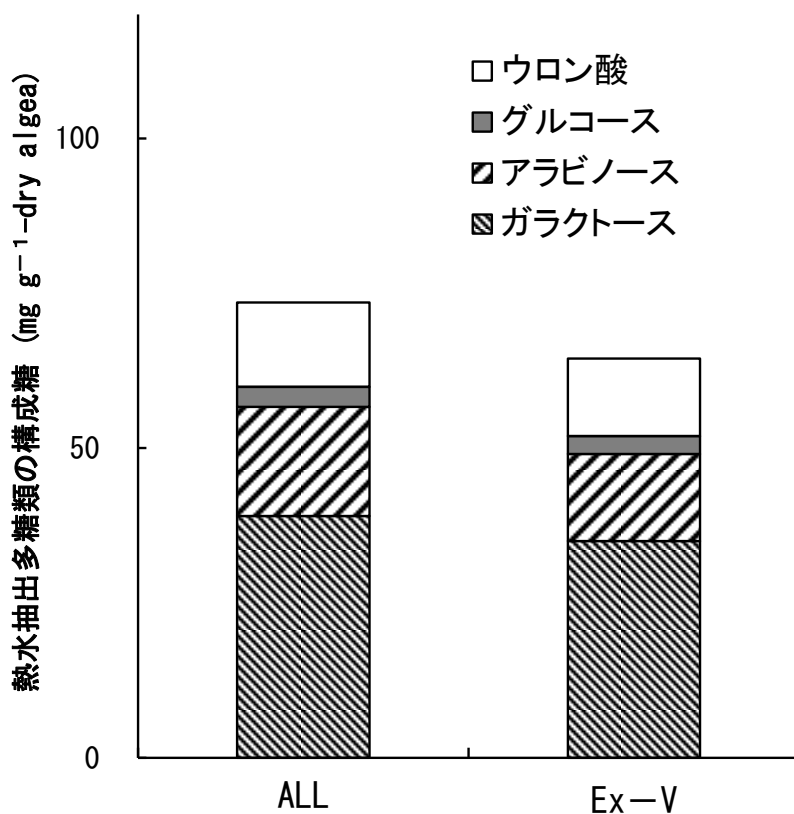


図 4-15 ALL 区(紫色光有)および Ex-V 区(紫色光無)で培養した *B. braunii* から熱水抽出された多糖類の組成 (±SD; n=3.)

4.4 まとめ

本章では、*B. braunii* から炭化水素を効率的に回収できる条件を把握するために、ピーク波長の異なる 6 種類の LED（紫色、青色、緑色、オレンジ色、赤色、遠赤色）を有する 6 波長帯光混合照射用 LED 光源を用い、ALL 区（紫色光有）および Ex-V 区（紫色光無）で *B. braunii* を培養した。

まず Ex-V 区では、ALL 区と比較して加熱処理による炭化水素の回収性が向上した。この時 2 つの試験区の *B. braunii* から回収された炭化水素の組成に変化はなかった。

炭化水素生産性が向上した Ex-V 区において、細胞外カロテノイドの生産量は、ALL 区と比較して減少することが明らかになった。これにより、*B. braunii* もほかの植物と同様に光障害を防ぐ防御機能を持つことが示唆された。そして、細胞外カロテノイドの減少は、結果的に ECM 構造を変化させ、ECM にある炭化水素の回収を容易にすることが示唆された。さらに、細胞外カロテノイドの減少が炭化水素含有量の増加につながったことも示唆された。

一方、*B. braunii* から熱水抽出される多糖類の溶出量についても、炭化水素生産性が向上した Ex-V 区において、炭化水素生産性の低かった ALL 区よりも 10 wt% 以上減少することが明らかになった。以上の結果から、*B. braunii* の ECM に含有する熱水抽出可能な多糖類の生成が減少すると、ECM に保持されている炭化水素の生産量は向上し、炭化水素の回収が容易になることが示唆された。さらに、多糖類の構成糖の詳細を確認したところ、Ex-V 区ではガラクトース、アラビノースを主とする中性糖およびウロン酸を主とする酸性糖が減少することを確認した。以上の結果から、ガラクトース、アラビノース、ウロン酸で構成される多糖類が、*B. braunii* の炭化水素の回収を阻害する物質であることが示唆された。同じ品種を用いて培地の組成を変えることで、炭化水素回収を容易にした報告 [16] もあり、培地の組成変化が多糖類に影響する可能性もある。今後、*B. braunii* 中のガラクトース、アラビノースおよびウロン酸で構成される熱水抽出可能な多糖糖の生成を抑制することで、*B. braunii* からの炭化水素回収が容易になることが期待される。

5 章 結論

5.1 本研究のまとめ

B. braunii からの加熱処理による炭化水素回収のメカニズムを解明することは、炭化水素回収を実用化するうえで非常に重要である。本研究では、以下の 4 点を本研究の目的とした。

① *B. braunii* から加熱処理により熱水抽出される多糖類に着目し、多糖類の化学組成、分子量および物理的特性を明らかにする。

② *B. braunii* から熱水抽出される多糖類と炭化水素の回収に用いる有機溶媒との相互作用を明らかにすることで、*B. braunii* からの炭化水素回収プロセスにおいて、熱水抽出される多糖類が炭化水素回収を阻害することを説明する。

③ 多糖類の熱物性変化を明らかにし、藻体スラリーに対して 80℃の加熱処理では不可能であった炭化水素回収が、90℃の加熱処理により炭化水素回収が可能となるメカニズムを説明する。

④ *B. braunii* からの炭化水素回収を阻害する熱水抽出多糖類の、構成成分を明らかにする。研究で得られた成果を以下にまとめた。

第 1 章では、本研究の背景と目的を述べた。

第 2 章では、*B. braunii* から熱水抽出される多糖類の溶出量、組成、分子量と両親媒性特性を明らかにした。*B. braunii* から 90℃で熱水抽出される多糖類は、溶出量が乾燥藻体重量の約 10%であり、ガラクトース、アラビノースを主とする中性糖およびウロン酸を主とする酸性糖で構成され、分子量がプルラン換算で 200 万以上の高分子化合物であった。また、この多糖類は、水 - 有機溶媒の混合系を乳化させる両親媒性高分子であることを明らかにした。さらに、熱水抽出多糖量を乾燥藻体重量の 0.5%以下になるまで藻体から除去することで、藻体に含まれる 90%以上の炭化水素が回収可能となることを明らかにした。

第 3 章では、*B. braunii* からの炭化水素回収において、90℃の加熱処理が必要となるメカニズムを解明するために、藻体の熱物性測定を行った。まず、藻体を構成するタンパク質は、約 64℃で熱変性し、タンパク質の変性後に熱水抽出される多糖類の溶出量が増大することを確認した。次に、藻体タンパク質の変性後、ガラクトース、アラビノース、ウロ

ン酸由来の酸性糖で構成する多糖類の溶出量が増加することが明らかになった。この熱水抽出される多糖類の熱分析から、藻体タンパク質の変性後 70、80℃で熱水抽出される多糖類は可逆的なゾルゲル転移を示すことを明らかにした。これらの多糖類は、常温に戻る過程で再ゲル化するため、藻体の周りに再付着し、炭化水素と有機溶媒の接触を妨げ、炭化水素の回収を阻害する可能性がある。一方、90℃で熱水抽出される多糖類は、ゾルゲル転移を示さず、不可逆的なゾル状態にあることが示唆された。90℃以上に藻体を加熱すると、熱水抽出される多糖類はゲル化能をもたず、藻体の周りに再付着しないため、有機溶媒が藻体に含有する炭化水素と容易に接触することが可能となり、炭化水素は、常温で溶媒回収可能となることが示唆された。そこで、70℃および 80℃で加熱温度を維持し、多糖類をゾル化させた状態で、藻体スラリーからの炭化水素回収を試みたところ、70℃でも藻体スラリーから 90%以上の炭化水素を回収することができた。また、90℃以上の加熱で熱水抽出される多糖類が不可逆的なゾル状態になる理由を明らかにするために、異なる温度で熱水抽出される多糖類の分子量測定を行った。90℃で熱水抽出される多糖類の分子量は、70℃、80℃で熱水抽出される多糖類と比較して、分子量が若干低下することが明らかになった。90℃で熱水抽出される多糖類は低分子化が原因による不可逆的な変性でゲル化能が低下し、常温においても藻体から炭化水素が容易に溶媒抽出可能となることが示唆された。以上により第 3 章では、*B. braunii* から高効率に炭化水素を回収するためには、熱水抽出される多糖類がゾル状態にあることが重要であり、不可逆的なゾル状態にするためには 90℃以上の加熱処理が必要であることを明かし、加熱による藻体からの炭化水素回収のメカニズムを説明した。

第 4 章では、炭化水素の回収を阻害する多糖類の構成成分を明らかにするために、6 波長混合照射用 LED を用い、炭化水素の回収性が向上する藻体と、炭化水素の回収性の低い藻体を生産し、熱水抽出される多糖類の溶出量と構成成分を比較した。多糖類の溶出量は、炭化水素の回収されやすい藻体において減少した。多糖類の構成糖については、炭化水素が回収されやすい藻体で、ガラクトース、アラビノース、ウロン酸を主とする酸性糖) で構成する多糖類が減少した。以上により、第 4 章では、ガラクトース、アラビノース、ウロン酸で構成する熱水抽出多糖類が、*B. braunii* からの炭化水素回収を阻害することを示した。

5.2 今後の展望

最後に、*B. braunii*からの炭化水素回収を実用化するための今後の展望を述べる。まず、プロセスコスト削減のための技術開発が必要である。炭化水素回収プロセスにおいて、藻体スラリーに加熱処理を施さなくても、有機溶媒で炭化水素を回収できることが望ましい。もし、*B. braunii*の炭化水素の回収を阻害すると思われる多糖類の生成を抑制できれば、容易に炭化水素回収が可能となると予測できる。特に、ガラクトース、アラビノース、ウロン酸で構成される多糖類を生成しない性質をもった *B. braunii*を育種培養できれば、加熱処理を施さなくとも容易に炭化水素回収が可能となる可能性がある。そのためには、*B. braunii*の遺伝と変異の実態を把握して効果的に選抜を行い、優良系統を増殖して実用化することが必要である。次の課題は、非溶媒化の検討である。回収溶媒として、現在は大豆油などの食用油抽出に用いられている水に不溶なノルマルヘキサンの使用が一般的であるが、このような有機溶媒は藻体に対して毒性が強い。有機溶媒の使用を極力削減し、*B. braunii*を生かしたままで炭化水素を回収する手法が確立できれば、原料となる藻体や有機溶媒のプロセス資源の節約だけでなく、次の炭化水素を生産するまでの培養時間を削減することが可能となり、炭化水素生産量の増大につながる。以上に述べた技術課題を解決していくことで、藻体からの炭化水素回収プロセスコストのさらなる削減が期待される。

燃料以外の用途を開発することも重要である。現在、事業化されている微細藻類は、クロレラやユーグレナなど大量生産が可能で、加工にあまり手を加えない食用藻類か、アスタキサンチン、フコキサンチンやフィコシアニンなどの色素、またフコイダン、アルギン酸ナトリウムなどに代表される糖類など、医薬品や化粧品、機能性食品素材として高価格で流通することが可能な藻類抽出物に限られる。そこで、*B. braunii*から医薬品や化粧品などの分野へ利用できる高付加価値物質を回収し、燃料源としての炭化水素生産コストを賄うようなトータルシステムの検討が必要となっている。本研究で検討した *B. braunii*から熱水抽出される多糖類が示す乳化性やゲル化性は高付加価値物質としての商業利用につながる可能性が高く、炭化水素生産事業化の手助けとなることが考えられる。これについてのさらなる検討を期待したい。

最後に、本研究の主要な成果は文献 [1-3]に公表されている。ご参照頂きたい。

参考文献

第1章

- [1] 横山伸也, 芋生憲司, バイオマスエネルギー, 森北出版株式会社, 166pp-, 2009
- [2] 三井物産戦略研究所, バイオマス資源としての微細藻類, 戦略研レポート, 2011
- [3] 芋生憲司, セルロース系エタノール生産の技術動向, *Feed Trade*, 48, 2-19, 2012
- [4] 長谷川文生, パルプ製造技術を利用したリグノセルロース系バイオマスからのエタノール生産, 東京大学大学院博士論文, 2013
- [5] Hasegawa, F., Saga, K., Kaizu, Y., Imou, K., Compression-grinding treatment of wet rice straw for bioethanol production, *J. Jpn. Inst. Energy*, 94, 321-326, 2015
- [6] 渡邊信, 藻類バイオマス, みみずく舎, 266pp-, 2010
- [7] Mayfield, S., The potential of micro-algae for the production of biofuels and bio-products, *International Symposium on Algal Biomass*, 2013
- [8] Darzin, A., Pienkos, P., Edye, L., Current status and potential for algal biofuels production, *IEA Bioenergy Task*, 39, 2010
- [9] Chisti, Y., Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.*, 25, 294-306, 2007
- [10] 微細藻培養技術事業化可能性調査共同事業体, 耕作放棄地における微細藻培養技術の確立と事業化方策の検討に係る事業化可能性調査報告, 2011
- [11] Terry, K. L., Raymond, L. P., System design for the autotrophic production of microalgae, *Enzyme Microb. Technol.*, 7, 474-87, 1985
- [12] Sheean, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P., A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program Biodiesel from Algae, 1998
- [13] NEDO, 海外レポート, No.1070, 2011
- [14] 大江徹男, 坂内久, アメリカの再生可能燃料基準 (RFS) の最終規則とバイオ燃料政策の方向性, 2010 年度日本国際経済学会関東支部大会, 2010
- [15] 石油エネルギー技術センター, 米国航空部門でバイオ燃料導入に関する最新動向, JPEC レポート, 2013
- [16] 日経バイオテク (2013 年 12 月 17 日号)
<https://bio.nikkeibp.co.jp/article/news/20131216/172914/>

最終アクセス 2015 年 10 月 15 日

[17] Nature Publishing Group, Algae bloom again, Nature, 447, 520–521, 2007

[18] NEDO, HP

http://www.nedo.go.jp/activities/CA_004551.html

最終アクセス 2015 年 10 月 15 日

[19] JST, HP

<http://www.jst.go.jp/presto/bioenergy/>

最終アクセス 2015 年 10 月 15 日

[20] 松井徹, 藻類バイオ燃料について, エネルギー総合工学 37(2), 54–63, 2014

[21] みずほ情報総研, 微細藻類等を利用した燃料等の生産に係る技術開発等の最新動向に係る検討報告書, 2012

[22] Parry Nutraceutical HP

<http://www.parrynutraceuticals.com/organic-spirulina.aspx>

最終アクセス 2015 年 10 月 15 日

[23] Ecoduna HP <http://www.ecoduna.com/>

最終アクセス 2015 年 10 月 15 日

[24] 松本光史, 田中剛, 野島大佑, 微細藻類を用いたバイオ燃料生産〈グリーンオイルー貫生産プロセスの構築〉, 配管技術, 2014(10), 16–20, 2014

[25] 平成 26 年度 東北復興次世代エネルギー研究開発プロジェクト 研究成果報告書, 2015

[26] 株式会社ちとせ研究所ホームページ

<http://www.chitose-bio.com/cl/news/174/>

最終アクセス 2015 年 8 月 2 日

[27] Gudin, C., Thepenier, C., Bioconversion of solar nergy into organic chemicals by microalgae, Adv. Biotechnol. Processes, 6, 73–110, 1986

[28] 佐賀清崇, 跡部季子, 孫田明忠, 芋生憲司, 微細藻類の濃縮プロセスにおけるエネルギー評価, 農業機械学会関東支部第 47 回年次報告会, 2011

- [29] 佐賀清崇, 跡部季子, 孫田明忠, 芋生憲司, 微細藻類 *Botryococcus braunii* のろ過濃縮に関する研究, 農業機械学会第 70 回年次大会, 2011
- [30] Venkataraman, L. V., New possibility for microalgae production and utilization in India, Arch. Hydrobiol. Beih. 11, 199–210, 1978
- [31] Jiang, J. Q., Graham, N. J. D., Harward, C., Comparison of polyferric sulphate with other coagulants for the removal of algae and algae-derived organic matter. Water Sci. Technol. 27, 221–230, 1993
- [32] 古橋賢一, 佐賀清崇, 長谷川文生, 岡田茂, 海津裕, 芋生憲司, 培地塩濃度が微細藻類 *Botryococcus braunii* の形態および炭化水素回収性に与える影響, 第 9 回バイオマス会議, 2014
- [33] Dote, Y., Sawayama, S., Inoue, S., Minowa, T., Yokoyama, S., Recovery of liquid fuel from hydrocarbon-rich microalgae by thermochemical liquefaction, Fuel, 73, 1855–1857, 1994
- [34] Andrich, G., Zinnai, A., Nesti, U., Venturi, F., Supercritical fluid extraction of oil from microalga *Spirulina (Arthrospira) platensis*, Acta Alimentaria, 35, 195–203, 2006
- [35] Patila, P. D., Gudeb, VG., Mannarswamy, A., Cooke, P., Nirmalakhandand, N., Lammerse, P., Denga, S., Comparison of direct transesterification of algal biomass under supercritical methanol and microwave irradiation conditions, Fuel, 97, 822–831, 2012
- [36] Kanda, K., Li, P., Simple extraction method of green crude from natural blue-green microalgae by dimethyl ether, Fuel, 90, 1264–1266, 2011
- [37] Liu, X., Sheng, J., Curtiss, R., Fatty acid production in genetically modified cyanobacteria, PNAS, 108, 6899–6904, 2011
- [38] Brown, A. C., Knights, B. A., Conway, E., Hydrocarbon content and its relationship to physiological state in the green alga *Botryococcus braunii*. Phytochem., 8, 543–547, 1969

- [39] Yamaguchi, K., Nakano, H., Murakami, M., Konosu, S., Nakayama, O., Kanda, M., Nakamura, A., Iwamoto, H., Lipid composition of a green alga, *Botryococcus braunii*, Agric. Biol. Chem., 51, 493–498, 1987
- [40] Senousy, H. H., Beakes, G. W., Hack, E., Phycogenetic placement of *Botryococcus braunii* (Trebouxiophyceae) and *Botryococcus sudeticus* isolate UTEX 2629 (Chlorophyceae). J. Phycol., 40, 412–423, 2004
- [41] Metzger, P., Largeau, C., Chemicals of *Botryococcus braunii*, in “Chemicals from Microalgae” (Ed. Cohen, Z.), 205–260, Taylor & Francis, London, 1999
- [42] Wake, L. V., Hillen, L. W., Study of a "bloom" of the oil-rich alga *Botryococcus braunii* in the Darwin river reservoir. Biotechnol. Bioeng., 22, 1637–1656, 1980
- [43] Swale, E. M. F., The phytoplankton of Oak Mere, Cheshire, 1963–1966. Br. Phycol. Bull., 3, 441–449, 1968
- [44] Wake, L. V., Hillen, L. W., Nature and hydrocarbon content of blooms of the alga *Botryococcus braunii* occurring in Australian freshwater lakes. Aust. J. Mar. Freshwater Res., 32, 353–367, 1981
- [45] Maxwell, J. R., Douglas, A. G., Eglinton, G., McCormic, A., The botryococcenes -hydrocarbons of novel structure from the alga *Botryococcus braunii*, Kützing. Phytochem., 7, 2157–2172, 1968
- [46] 井上勲, 藻類 30 億年の自然史 藻類から見る生物進化・地球・環境 第 2 版, 東海大学出版会, 2007
- [47] Weiss, T. L., Chun, H. J., Okada, S., Vitha, S., Holzenburg, A., Laane, J., Devarenne T. P., Raman spectroscopy analysis of botryococcene hydrocarbons from the green microalga *Botryococcus braunii*. J. Biol. Chem., 285, 32458–32466, 2010
- [48] Largeau, C., Casdadevall, E., Berkaloﬀ, C., Dhamelin-court, P., Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in *Botryococcus braunii*. Phytochem., 19, 1043–1051, 1980

- [49] Metzger, P., Berkloff, C., Casadevall, E., Coute, A., Alkadiene- and botryococcene-producing races of wild strains of *Botryococcus braunii*. *Phytochem.*, 24, 2305–2312, 1985
- [50] Templier, J., Largeau, C., Casadevall, E., Mechanism of non-isoprenoid hydrocarbon biosynthesis in *Botryococcus braunii*. *Phytochem.*, 23, 1017–1028, 1984
- [51] Templier, J., Largeau, C., Casadevall, E., Biosynthesis of *n*-alkatrienes in *Botryococcus braunii*. *Phytochem.*, 30, 2209–2215, 1991
- [52] Metzger, P., Casadevall, E., Pouet, M. J., Pouet, Y., Structures of some botryococcenes: branched hydrocarbons from the B-race of the green alga *Botryococcus braunii*. *Phytochem.*, 24, 2995–3002, 1985
- [53] Huang, Z., Poulter, C. D., Tetramethylsqualene, a triterpene from *Botryococcus braunii* var. Showa. *Phytochem.*, 28, 1467–1470, 1989
- [54] Metzger, P., Allard, B., Casadevall, E., Structure and chemistry of new chemical race of *Botryococcus braunii* (Chlorophyceae) that produces lycopadiene, a tetraterpenoid hydrocarbon. *J. Phycol.*, 26, 258–266, 1990
- [55] Metzger, P., Casadevall, E., Lycopadiene, a tetraterpenoid hydrocarbon from new strains of the green alga *Botryococcus braunii*. *Tetrahedron Lett.*, 28, 3931–3934, 1987
- [56] Metzger, P., David, M., Casadevall, E., Biosynthesis of triterpenoid hydrocarbon in the B-race of the green alga *Botryococcus braunii*. Sites of production and nature of the methylating agent. *Phytochem.*, 26, 129–134, 1987
- [57] Kitazato, H., Asaoka, S., Iwamoto, H., Catalytic cracking of hydrocarbons from microalgae. *Sekiyu Gakkaishi*, 32, 28–34, 1989
- [58] (財) バイオインダストリー協会, (財) エンジニアリング振興協会, バイオテクノロジー利用による新燃料油生産, 利用技術に関するフィージビリティ調査—微細藻類による燃料油生産システムに関する調査研究—. 41–43, 1987

- [59] Frenz, J., Largeau, C., Casadevall, E., Kollerup, F., Daugulis, A. J., Hydrocarbon recovery and biocompatibility of solvents for extraction from cultures of *Botryococcus braunii*. Biotechnol. Bioeng., 34, 755–762, 1989
- [60] Lee, J. Y., Yoo, C., Jun, S. Y., Ahn, C. Y., Oh, H. M., Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. Biores. Technol., 101, 75–77, 2009
- [61] Kita, K., Okada, S., Sekino, H., Imou, K., Yokoyama, S., Amano, T., Thermal pre-treatment of wet microalgae harvest for efficient hydrocarbon recovery. Appl. Energy., 87, 2420–2423, 2010
- [62] Magota, A., Saga, K., Okada, S., Atobe, S., Imou, K., Effect of thermal pretreatments on hydrocarbon recovery from *Botryococcus braunii*. Bioresour. Technol., 123, 195–198, 2012
- [63] Saga, K., Magota, A., Atobe, S., Okada, S., Imou, K., Osaka, N., Matsui, T., Hydrocarbon recovery from concentrated algae slurry via thermal pretreatment. J. Jpn. Inst. Energy, 92, 1214–1219, 2013
- [64] 孫田明忠, 加熱前処理による *Botryococcus braunii* からの炭化水素抽出. 東京大学大学院博士論文, 2014

第 2 章

- [1] Kita, K., Okada, S., Sekino, H., Imou, K., Yokoyama, S., Amano, T., Thermal pre-treatment of wet microalgae harvest for efficient hydrocarbon recovery. Appl. Energy., 87, 2420–2423, 2010
- [2] Magota, A., Saga, K., Okada, S., Atobe, S., Imou, K., Effect of thermal pretreatments on hydrocarbon recovery from *Botryococcus braunii*. Bioresour. Technol., 123, 195–198, 2012

- [3] Saga, K., Magota, A., Atobe, S., Okada, S., Imou, K., Osaka, N., Matsui, T.,
Hydrocarbon recovery from concentrated algae slurry via thermal pretreatment. *J. Jpn. Inst. Energy*, 92, 1214–1219, 2013
- [4] Allard, B., Casadevall, E., Carbohydrate composition and characterization of sugars
from the green microalga *Botryococcus braunii*. *Phytochem.*, 29, 1875–1878, 1990
- [5] Okada, S., Murakami, M., Yamaguchi, K., Hydrocarbon composition of newly
isolated strains of the green microalga *Botryococcus braunii*. *J. Appl. Phycol.*, 7,
555–559, 1995
- [6] Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D.,
Technical Report. NREL/TP-510-42618, 2008
- [7] Ueda, S., Fujita, K., Komatsu, K., Nakashima, Z., Polysaccharide produced by the
genus *Pullularia*. I. Production of polysaccharide by growing cells. *Appl. Microbiol.*,
11, 211–215, 1963
- [8] 山田信夫, 新訂増補版 海藻利用の科学, 成山堂, 462pp-, 2013
- [9] 國崎直道, 佐野征男, 食品多糖類 乳化・増粘・ゲル化の知識, 幸書房, 243pp-, 2001
- [10] 山田信夫, 海草と育毛, 成山堂, 232pp-, 2010
- [11] 株式会社東ソー分析センター, GPC 法 (SEC 法) 入門講座, 技術レポート No.T1001,
2013 年 10 月 1 日, 1–6,
- [12] Metzger, P., Casadevall, E., Pouet, M. J., Pouet, Y., Structures of some
botryococcenes: branched hydrocarbons from the B-race of the green alga
Botryococcus braunii. *Phytochem.*, 24, 2995–3002, 1985
- [13] Huang, Z., Poulter, C. D., Tetramethylsqualene, a triterpene from *Botryococcus*
braunii var. *Showa*. *Phytochem.*, 28, 1467–1470, 1989
- [14] Kitazato, H., Asaoka, S. Iwamoto, H., Catalytic cracking of hydrocarbons from
microalgae. *Sekiyu Gakkaishi*, 32. 28–34, 1989
- [15] Chanda, S. K., Hirst, E. L., Percival, E. G. V., Ross, A. G., The structure of alginic
acid. Part II. *J. Chem. Soc.*, 1952, 1833–1837, 1939

- [16] Nelson, W. L., Cretcher, L. H., The alginic acid from *Macrocystis pyrifera*. J. Am. Chem. Soc., 51, 1914–1922, 1929
- [17] Nelson, W. L., Cretcher, L. H., The properties of d-mannuronic acid lactone. J. Am. Chem. Soc., 54, 3409–3412, 1932
- [18] Dickinson, E., Galazka, V. B., Anderson, D. M. W., Emulsifying behaviour of gum arabic. Part 1: Effect of nature of the oil phase on the emulsion droplet-size distribution. Carbohydr. Polym., 14, 373–383, 1991a
- [19] Dickinson, E., Galazka, V. B., Anderson, D. M. W., Emulsifying behaviour of gum arabic. Part 2: Effect of the gum molecular weight on the emulsion droplet-size distribution. Carbohydr. Polym., 14, 385–392, 1991b
- [20] Dickinson, E., Murray, B. S., Stainsby, G., Anderson, D. M. W., Surface activity and emulsifying behaviour of some Acacia gums. Food Hydrocolloid., 2, 477–490, 1988
- [21] Randall, R. C., Phillips, G. O., Williams, P. A., The role of the proteinaceous component on the emulsifying properties of gum arabic. Food Hydrocolloid., 2, 131–140, 1988

第3章

- [1] Dote, Y., Sawayama, S., Inoue, S., Minowa, T., Yokoyama, S., Recovery of liquid fuel from hydrocarbon-rich microalgae by thermochemical liquefaction. Fuel, 73, 1855–1857, 1994
- [2] Kita, K., Okada, S., Sekino, H., Imou, K., Yokoyama, S., Amano, T., Thermal pre-treatment of wet microalgae harvest for efficient hydrocarbon recovery. Appl. Energy, 87, 2420–2423, 2010
- [3] Weiss, T. L., Roth, R., Goodson, C., Vitha, S., Black, I., Azadi, P., Rusch, J., Holzenburg, A., Devarenne, T. P., Goodenough, U., Colony organization in the green alga *Botryococcus braunii* (Race B) is specified by a complex extracellular matrix. Eukaryotic Cell, 11, 1424–1440, 2012

- [4] Furuhashi, K., Noguchi, T., Okada, S., Hasegawa, F., Kaizu, Y., Imou, K.:The surface structure of *Botryococcus braunii* colony prevents the entry of extraction solvents into the colony interior. *Algal Res.*, 16 (2016) 160–166
- [5] Okada, S., Murakami, M., Yamaguchi, K., Hydrocarbon composition of newly isolated strains of the green microalga *Botryococcus braunii*. *J. Appl. Phycol.*, 7, 555–559, 1995
- [6] 分析化学実技シリーズ 熱分析, 共立出版, 184pp–, 2012
- [7] Setaram HP
<http://www.setaram.com/setaram-products/calorimetry/microcalorimetry/microdsc7-evo/>
 最終アクセス 2015 年 12 月 8 日
- [8] Ben-Amotz, A., Tornabene, A. G., Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J. Phycol.*, 21, 72–81, 1985
- [9] Vaquez-Duhalt, R., Arredondo-Vega, B. O., Haloadaptation of the green alga *Botryococcus braunii* (race A). *Phytochem.*, 30, 2919–2925, 1991
- [10] 野口駿, 食品と水の化学, 幸書房, 131–135, 1992
- [11] Dodgson, K. S., Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymatic and nonenzymatic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. *Biochem. J.*, 78, 312–329, 1961
- [12] Dubois, M., Gilles, K. A., Hamirlton, J. K., Robers P. A., Smith F., Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, 350–356, 1956
- [13] Hang, A., Larsen, B., Smidsrød, O., Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid. *Acta. Chem. Scand.*, 21, 691–704, 1967
- [14] Rinaudo, M., On the relation structure-properties of some polysaccharides used in the food industry, In: Nishinari K, Doi E (ed) *Food Hydrocolloids- Structures, Properties, and Functions*. Plenum Press, New York, 35–44, 1994

- [15] Nishinari, K., Doi, E., (Eds), Food Hydrocolloids-Structures, Properties, and Functions. Plenum Press, New York, 1994
- [16] Nishinari, K., (Eds), Hydrocolloids. Vols 1, 2, Elsevier, Amsterdam, 2000
- [17] Chanda, S. K., Hirst E. L., Percival E. G. V., Ross A. G., The structure of alginic acid. Part II, J. Am. Chem. Soc., 1952, 1833–1837, 1939
- [18] Nelson, W. L., Cretcher, L. H., The alginic acid from *Macrocystis Pyrifera*. J. Am. Chem. Soc., 51, 1914–1922, 1929
- [19] Nelson, W. L., Cretcher, L. H., The properties of d-mannuronic acid lactone. J. Am. Chem. Soc., 54, 3409–3412, 1932
- [20] Miyoshi, E., Takaya, T., Nishinari, K., Gel-sol transition in gellan aqueous solutions. Macromol. Symp., 99, 83–91, 1995
- [21] Rees, D. A., Steele, I. W., Williamson, F. B., Conformation analysis of polysaccharides. III. The relation between stereochemistry and properties of some natural polysaccharide sulfates (1). J. Polym. Sci., 28, 261–276, 1969

第 4 章

- [1] Frenz, J., Largeau, C., Casadevall, E., Kollerup, F., Daugulis, A. J., Hydrocarbon recovery and biocompatibility of solvents for extraction from cultures of *Botryococcus braunii*. Biotechnol. Bioeng., 34, 755–762, 1989
- [2] Chisti, Y., Biodiesel from microalgae. Biotechnol. Adv., 25, 294–306, 2007
- [3] Weiss, T. L., Roth, R., Goodson, C., Vitha, S., Black, I., Azadi, P., Rusch, J., Holzenburg, A., Devarenne, T. P., Goodenough, U., Colony organization in the green alga *Botryococcus braunii* (Race B) is specified by a complex extracellular matrix. Eukaryotic Cell, 11, 1424–1440, 2012
- [4] Grung, M., Metzger, P., Liaaen-Jensen, S.. Primary and secondary carotenoids in two races of *Botryococcus braunii*. Biochem. System. Ecol., 17, 263–269, 1989

- [5] Okada, S., Matsuda, H., Murakami, M., Yamaguchi, K., Botryoxanthin-A a new member of the new class of carotenoids from green microalga *Botryococcus braunii*, Berkeley. Tetrahedron Lett., 37, 1065–1068, 1996
- [6] Okada, S., Tonegawa, I., Matsuda, H., Murakami, M., Yamaguchi, K., Braunixanthins 1 and 2, new carotenoids from the green microalga *Botryococcus braunii*. Tetrahedron, 53, 11307–11316, 1997
- [7] Boussiba, S., Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. Physiol. Plant, 108, 111–117, 2000
- [8] アスタキサンチン工業会 HP
<http://www.asta-ma.jp/astaxanthin/index.html>
 最終アクセス 2016 年 3 月 11 日
- [9] Okada, S., Murakami, M., Yamaguchi, K.. Hydrocarbon composition of newly isolated strains of the green microalga *Botryococcus braunii*. J. Appl. Phycol., 7, 555–559, 1995
- [10] Mcbeth, J. W. Carotenoids from nudibranchs. Comp. Biochem. Physiol., 41, 55–68, 1972
- [11] Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D., Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Technical Report, NREL/TP-510-42618, 2008
- [12] Metzger, P., Béatrice, Allard, B., Casadevall, E., Berkaloff, C., Couté, A., Structure and chemistry of a new chemical race of *Botryococcus braunii* (*Chlorophyceae*) that produces lycopadiene, a tetraterpenoid hydrocarbon. J. Phycol., 26, 258-266, 1990
- [13] Metzger, P., Berkaloff, C., Casadevall, E., Coute, A., Alkadiene- and botryococcene-producing races of wild strains of *Botryococcus braunii*. Phytochem., 24, 2305-2312, 1985
- [14] Wolf, F. R., Nonomura, A. M., Bassham, J. A., Growth and branched hydrocarbon production in a strain of *Botryococcus braunii* (*Chlorophyta*). J. Phycol., 21, 388–396, 1985

- [15] Ooyama, H. E., Hayashi, A., Mamura, T., Ide, T., Hino, T., Tanigami, T., Yoshida, K., Photophysical properties and photostability of novel unsymmetric polycyclicphenazine-type D- π -A fluorescent dyes and the dye-doped films. J. Photochem. Photobiol. A Chem., 230, 38–46, 2012
- [16] Furuhashi, K., Saga, K., Okada, S., Imou, K., Seawater-cultured *Botryococcus braunii* for efficient hydrocarbon extraction. PLoS ONE, 8(6), e66483. doi: 10.1371/journal.pone.0066483, 2013

第 5 章

- [1] Atobe, S., Saga, K., Hasegawa, F., Furuhashi, K., Tashiro, Y., Suzuki, T., Okada, S., Imou, K., Effect of amphiphilic polysaccharides released from *Botryococcus braunii* Showa strain on hydrocarbon recovery. Algal Res., 10, 172–176, 2015
- [2] Atobe, S., Saga, K., Hasegawa, F., Magota, A., Furuhashi, K., Okada, S., Suzuki, T., Imou, K., The effect of the water-soluble polymer released from *Botryococcus braunii* Showa strain on solvent extraction of hydrocarbon. J. Appl. Phycol., 27, 755–761, 2015
- [3] Atobe, S., Saga, K., Maeyama, H., Fujiwara, K., Okada, S., Imou, K., Culture of the green microalga *Botryococcus braunii* Showa with LED irradiation eliminating violet light enhances hydrocarbon production and recovery. Biosci. Biotechnol. Biochem., 78, 1765–1771, 2014

謝辞

本論文は、著者が東京大学大学院農学生命科学研究科在職中に行った研究の成果をまとめたものである。本研究は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) による戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業「微細藻類による高効率炭化水素生産プロセスの研究開発」の研究資金により実施された。本論文をまとめるにあたり、多くの方々に御指導、御教示を賜った。

まず、本論文を取りまとめるに際しての御指導、並びに学位審査の際の主査として終始懇切丁寧なご指導、ご鞭撻を賜った東京大学大学院農学生命科学研究科生物機械工学研究室の芋生憲司教授に敬意と感謝の意を表する。芋生教授の励ましがあって、最後まで本論文を取りまとめることができた。

東京大学水圏天然物化学研究室の岡田茂准教授には、投稿論文や学会発表のための研究成果まとめるにあたり、沢山のご指導ご助言を賜った。東京大学生物環境工学研究室の富士原和宏教授には、6 波長混合照射用 LED を用いた培養でのご指導、ご助言を賜った。東京大学生物機械工学研究室の海津裕准教授には、同研究室で有意義に研究が出来るようご指導ご助言ご協力を賜った。また、同研究室の佐賀清崇博士（現在、株式会社 Biomaterial in Tokyo）には、本研究を計画し実行しまとめるまで、多くのご指導ご助言を賜った。深く感謝申し上げる。

本研究を行うにあたり、東京海洋大学食品冷凍学研究室の鈴木徹教授には、藻体や熱水抽出多糖類の DSC 測定の研修や実験のご指導だけではなく、FT-IR、DXR 顕微レーザーラマンを使った解析の技術的な研修や実験のご指導ご助言を賜った。また、東京海洋大学大学院食品物性学研究室の田代有里助教には、多糖類の分子量測定において、高温 GPC 測定のご指導ご助言を賜った。また、同研究室の松川慎吾准教授には、熱水抽出多糖類の分子量に関する解析手法についてのご助言を賜った。熱水抽出多糖類の動的粘弾性測定、磁場勾配 NMR 測定においてもご協力を賜った。本研究は、東京海洋大学の実験装置による研究成果がメインとなった。快く装置を貸して下さった東京海洋大学の先生方、特に、各先生方にお口添えして下さった鈴木徹教授には心より感謝申し上げる。

東京大学大学院農学生命科学研究科の長谷川文生博士には、熱水抽出多糖類の HPLC 測定をはじめ多くのご指導ご助言を賜った。本研究を進める上で、数多くのヒントを頂いた。

東京大学大学院生物環境工学研究室の前山温子研究員には、LED 装置による培養管理でご協力を賜った。技術基盤センター先端機器系技術室の堀吉満氏、東京大学大学院大学院理学系研究科有機元素分析室上坪和子氏、さらに、英光精機株式会社、株式会社リガク、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社、株式会社島津製作所の皆様には、測定に関する技術的なご指導を賜った。東京大学生物機械工学研究室（現在、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構）の孫田明忠博士、古橋賢一博士（現在、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構）、昔農英夫氏、東京ス株式会社の松井徹博士、大坂典子氏には、共同研究者として貴重なご意見いただいた。さらに、東京大学生物機械工学研究室の院生・学生諸氏、秘書の滝口聡子氏には大変お世話になった。楽しい4年間を過ごすことができた。

以上の方々、並びにここに挙げることのできなかった数え切れないほどの皆様のご協力およびご助言を得て本論文を完成させることができた。末筆となったが、筆者の研究生活を支えてくれた友人、筆者の人生を常に応援し続けてくれた両親、最愛の子供たちに心から感謝する。